

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE 2013/2014

**DESENVOLVIMENTO DE UM POLÍMERO IMPRESSO
MOLECULARMENTE PARA ANÁLISE DE GALAXOLIDE EM MATRIZES
AMBIENTAIS**

GUILHERME SAMPAIO FERREIRA LEITÃO

Dissertação submetida para obtenção do grau de

MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

Orientador académico: Lúcia Maria da Silveira Santos
(Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da
Universidade do Porto)

Coorientador académico: Maria Arminda Costa Alves
(Professor Associado do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da
Universidade do Porto)

janeiro de 2014

Agradecimentos

É com grande satisfação que expresso o meu agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao LEPABE (Laboratório de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia) do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto por todos os meios disponibilizados para a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial ao Leandro Figueiredo, sem o qual a realização desta tese não seria possível, por todos os ensinamentos, por todo o acompanhamento, disponibilidade e paciência ao longo deste projeto e por todo o apoio e preocupação constantes, especialmente nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Dr. Lúcia Santos, pelo apoio, acompanhamento, incentivo e preocupação pelo meu bem-estar ao longo deste trabalho.

À minha coorientadora, Dr. Arminda Alves, pela ajuda e acompanhamento no trabalho

À Patrícia Correia pelos ensinamentos e introdução ao HPLC.

A todo o grupo do laboratório MIA201 pelo bom ambiente de trabalho proporcionado, especialmente à Sara pelos conselhos e preocupação com a parte escrita.

Aos meus amigos que me acompanharam neste percurso, especialmente à Lenny e ao Rafa pelo apoio e incentivo nos momentos mais complicados.

Por fim uma palavra de profunda gratidão aos meus pais Manuela, Jorge e Fernando, a quem devo muito do que sou hoje, por tudo o que me proporcionam e por todo o apoio e preocupação que tiveram em relação a esta tese.

Resumo

Os *musks* são compostos orgânicos que se inserem na categoria de poluentes emergentes. Estes compostos são utilizados em produtos de higiene pessoal e doméstica devido aos seus aromas característicos e capacidades fixativas de fragâncias. Dentro deste grupo de compostos é possível definir quatro classes: nitro *musks*, *musks* policíclicos, *musks* macrocíclicos e *musks* alicíclicos. O *galaxolide* é o *musk* policíclico mais comum e a sua produção e utilização nos últimos anos tem sido proeminente a par do decréscimo da utilização dos nitro *musks*. Devido à sua vasta utilização este composto foi já detetado em diversos compartimentos ambientais tais como águas, lamas e sedimentos e ainda em sangue e tecido adiposo humano.

Com este trabalho pretendeu-se desenvolver um polímero impresso molecularmente (MIP) seletivo ao *galaxolide*, com o objetivo de ser utilizado como sorbente de extração na análise deste composto em matrizes ambientais, por HPLC-FL.

O polímero impresso molecularmente foi sintetizado pelo método de polimerização por suspensão utilizando *galaxolide* (HHCB) como *template*. Os restantes constituintes, nomeadamente monómero funcional, *cross-linker*, iniciador radicalar, solvente porogénico e tensioativo foram respetivamente: ácido metacrílico (MAA), etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA), 2,2-Azobis(2-metil-propionitrilo) (AIBN), acetonitrilo (ACN) e álcool polivinílico hidrolisado (PVA). Foi feito um estudo de otimização da síntese avaliando a influência das razões molares *template*/monómero e monómero/*cross-linker* em nove formulações diferentes. A taxa de impressão, quantidade de *template* que fica retida na matriz do polímero em relação à quantidade inicial presente na reação, rondou os 99% em todos os casos. A extração do *template* foi realizada por *Sohxlet* utilizando como solvente uma solução de metanol/ácido acético (9/1, v/v). Foi possível obter uma eficiência de extração de 89% para um dos exemplos estudados. Foi também avaliada a influência do solvente nas capacidades adsorptivas do MIP com três solventes diferentes: ACN, ACN/H₂O (80/20) e H₂O; tendo-se verificado que o MIP se comporta melhor quando o analito se encontra em água.

Relativamente à validação do método analítico foi obtida uma gama de linearidade entre 0,4 e 700 µg.L⁻¹ com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9998. Os limites de deteção (0,09 µg.L⁻¹) e quantificação (0,3 µg.L⁻¹) foram calculados com base na razão sinal-ruído. A precisão foi avaliada segundo uma análise de repetibilidade e precisão intermédia tendo-se obtido respetivamente os coeficientes de variação médios de 3,2% e 6,9%. A exatidão (avaliada pela percentagem de recuperação usando o método das adições de padrões, %R) foi avaliada a dois níveis, para os filtrados e para os extratos. Foram obtidas respetivamente recuperações de aproximadamente 94% e 117%.

Palavras-chave:

Galaxolide, *Musks*, Polímeros impressos molecularmente, MIPs, HPLC-FL, Extração por *Sohxlet*

Abstract

Musks are a class of organic compounds considered emerging pollutants. They are incorporated in a wide variety of personal care products due to their pleasant scents and fixative properties. Musks are typically divided into four different classes: nitro musks, polycyclic musks, macrocyclic musks and alicyclic musks.

Galaxolide is the most common polycyclic musk and its production and usage in recent years has been preeminent along with the decrease in the consumption of nitro musks. Due to its widespread use this compound has been detected in several environmental compartments such as water, sludge, sediments and even in blood and human adipose tissue.

This work carried out development of a molecularly imprinted polymer intended to be used as an extraction sorbent for the analysis of galaxolide in environmental matrices, by HPLC-FL.

The molecularly imprinted polymer was synthesized by suspension polymerization method and using galaxolide (HHCB) as template. The other constituents, including functional monomer, cross-linker, free radical initiator, porogen and surfactant were: methacrylic acid (MAA), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), 2,2-azobis(2-methyl-propionitrile) (AIBN), acetonitrile (ACN) and hydrolyzed polyvinyl alcohol (PVA). An optimization study of the synthesis process, evaluating the influence of the molar ratios of template/monomer and monomer/cross linker was elaborated. The imprinting rate, amount of template that is retained in the polymer matrix in comparison to the initial amount present in the reaction, was around 99% in all cases. Extraction of template was performed by Soxhlet using a solution of methanol/acetic acid (9/1, v/v) as solvent. In the best scenario an extraction efficiency of 89 % was obtained. We also assessed the influence of the solvent on the adsorptive capacity of the MIP studying three different solvents: ACN, ACN/H₂O (80 /20) and H₂O. It concluded that the MIP performs best when the analyte is in water.

To validate the analytical method a range of linearity between 0.4 and 700 µg.L⁻¹ with a correlation coefficient (R^2) of 0.9998 was obtained. The limits of detection (0.09 µg.L⁻¹) and quantification (0.3 µg.L⁻¹) were calculated based on the signal to noise ratio. Precision was evaluated according to an analysis of repeatability and intermediate precision. Respectively, average coefficients of variation of 3.2 % and 6.9 % were obtained. The accuracy (recovery ratio measured by using the method of standard additions, %R) was evaluated at two levels, with the filtrates and the extracts. Respectively, recoveries of about 94% and 117% were obtained.

Índice

1	Enquadramento	1
2	Introdução.....	2
2.1	Organização da Tese	2
2.2	<i>Musks</i> e o <i>galaxolide</i> . A sua problemática.	2
2.3	Tecnologia de Impressão Molecular	9
2.3.1	Processo de formação do Complexo Monómero- <i>template</i>	11
2.3.2	Reagentes e condições utilizados em Impressão Molecular	12
2.3.3	Métodos de polimerização.....	14
2.3.4	Caracterização de MIPs	16
2.4	Método de análise do <i>galaxolide</i>	17
2.4.1	Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	17
2.4.2	Deteção por fluorescência (FL)	18
3	Estado da Arte	19
4	Descrição Técnica.....	21
4.1	Reagentes	21
4.2	Instrumentação - HPLC-FL.....	21
4.3	Preparação de padrões	22
4.4	Síntese do MIP e do NIP	22
4.5	Otimização do processo de síntese	24
4.6	Extração do <i>template</i>	25
4.7	Estudo da influência do solvente no processo de adsorção do MIP.....	26
4.8	Tratamento/encaminhamento de resíduos.....	27
5	Resultados e Discussão.....	28
5.1	Validação do método analítico de <i>galaxolide</i> por HPLC-FL.....	28
5.1.1	Avaliação da precisão	31
5.1.2	Avaliação da exatidão	32
5.2	Avaliação da taxa impressão do HHCB no MIP	33

5.3	Avaliação da eficiência de extração de HHCB no MIP	33
5.4	Avaliação da influência do solvente no processo de adsorção do MIP	36
6	Conclusões	38
7	Limitações e Trabalho Futuro	39
8	Referências Bibliográficas	40
Anexo 1	Parâmetros da reta de calibração.....	I

Índice de Figuras

Figura 1 - Consumo de HHCB e AHTN na europa, em toneladas (adaptado de HERA, 2004; EU-RAR, 2008).	7
Figura 2 - Distribuição de musks sintéticos em artigos domésticos segundo o estudo de 2008. (adaptado de Zhang et al., 2008).	8
Figura 3 - Representação esquemática do processo de formação de um MIP (adaptado de Chen et al 2011)	10
Figura 4 - Estrutura molecular de alguns cross-linkers utilizados em MIPs (adaptado de Tarley et al., 2005).	13
Figura 5 - Ensaio de adsorção (adaptado de Kim, 2004).	16
Figura 6 - Constituintes de um sistema HPLC	17
Figura 7 - Ilustração do equipamento utilizado no processo de síntese do MIP.....	23
Figura 8 - Ilustração do ensaio de extração por Soxhlet.....	26
Figura 9 - Cromatograma correspondente ao padrão de HHCB, 80 µg.L ⁻¹ , em ACN/H ₂ O.	28
Figura 10 - Reta de calibração de HHCB em ACN/H ₂ O.	29
Figura 11 - Eficiência de extração nos primeiros 6 MIPs.....	34
Figura 12 - Eficiências de extração para os MIPs 4,4A e 4B.	35
Figura 13 - Retas de calibração para HHCB em H ₂ O e em ACN.	36
Figura 14 - Estudo de adsorção em ACN/H ₂ O, ACN e H ₂ O.	37

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos nitro musks (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013)...</i>	<i>3</i>
<i>Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos musks policíclicos (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013).</i>	<i>4</i>
<i>Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos musks macrocíclicos (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013).</i>	<i>5</i>
<i>Tabela 4 - Propriedades físico-químicas dos musks alicíclicos (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013).</i>	<i>5</i>
<i>Tabela 5 - Exemplo de alguns monómeros utilizados em MIP e respetivos tipos de ligações/interações (adaptado de Tarley et al., 2005).</i>	<i>13</i>
<i>Tabela 6 - Razões molares de template, monómero e cross-linker empregadas na síntese dos polímeros.</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 7 - Padrões injetados de HHCB em ACN/H₂O para obtenção da reta de calibração e respetiva resposta.</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 8 - Parâmetros de linearidade associados à reta de calibração da quantificação do HHCB (sendo A a área do pico cromatográfico e C a concentração de HHCB em $\mu\text{g.L}^{-1}$).</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 9 - Limites de deteção (X_{LD}) e quantificação (X_{LQ}) obtidos para a reta de calibração..</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 10 - Valores obtidos para cálculo da repetibilidade.</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 11 - Valores obtidos para cálculo da precisão intermédia.</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 12 - Cálculo da percentagem de recuperação.</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 13 - Taxa de impressão do galaxolide para as diferentes formulações.</i>	<i>33</i>
<i>Tabela 14 - Taxa de impressão do galaxolide no MIP4, 4A e 4B.</i>	<i>34</i>

Notação e Glossário

Lista de Siglas

ACN	Acetonitrilo
AHMI	<i>Musk phantolide</i>
AHTN	<i>Musk tonalide</i>
AIBN	2,2'-azobisisobutironitrilo
CE	Eletroforese capilar
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
EGDMA	Etilenoglicol dimetacrilato
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
FL	Fluorescência
FQ	Fluoroquinolona
HHCB	<i>Musk galaxolide</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência
K _{ow}	Coeficiente de partilha octanol-água
MAA	Ácido metacrílico
MEPS	<i>Microextraction by packed sorbent</i>
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>
MK	<i>Musk ketone</i>
MX	<i>Musk xylene</i>
NIP	<i>Non-imprinted Polymer</i>
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVA	Álcool polivinílico hidrolisado
rpm	Rotações por minuto
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid-phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (<i>Solid-phase microextraction</i>)
TLC	Cromatografia em camada fina
UV	Ultravioleta

1 Enquadramento

Nos últimos 20 anos tem sido documentada com frequência crescente a presença de novos compostos químicos no meio ambiente. Atividades industriais, agrícolas e municipais são as principais fontes dos que são agora denominados “poluentes emergentes”. A US EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) define poluentes emergentes como novos compostos químicos sem estatuto regulamentar e cujos efeitos no ambiente e saúde humana são ainda escassos ou desconhecidos. Uma definição mais abrangente engloba poluentes que não estão atualmente incluídos nas rotinas de monitorização e que possam ser candidatos a futura regulamentação, dependendo de estudos a nível da sua ecotoxicidade, potenciais efeitos na saúde e ocorrência nos vários compartimentos ambientais. Não sendo necessariamente novos compostos químicos ou biológicos, incluem poluentes que tenham sido frequentemente identificados no meio ambiente e vastamente utilizados em todo o mundo mas que a sua presença e significância está só agora a ser elucidada. Nesta categoria inserem-se os *musks*, compostos químicos artificiais utilizados há décadas em misturas de fragâncias adicionadas essencialmente a produtos de higiene pessoal e doméstica. Estudos recentes indicam que estes podem atuar a nível do sistema endócrino perturbando as defesas naturais do indivíduo contra químicos tóxicos. A vasta utilização destes compostos levou à sua deteção em vários compartimentos ambientais como rios, lagos, sedimentos, peixes e até em leite, sangue e tecidos humanos. Atualmente o composto deste grupo mais extensivamente utilizado a nível global é conhecido comercialmente como *galaxolide* (Deblonde *et al.*, 2011; Alves, 2011; Heberer, 2002).

À medida que novos contaminantes do meio ambiente vão sendo descobertos a necessidade de métodos sensíveis e seletivos para a sua análise torna-se essencial. A tecnologia de impressão molecular surge como um método promissor na área das análises químicas tendo sido alvo de estudo e desenvolvimento extensivo nos últimos anos. Polímeros impressos molecularmente são materiais fortemente reticulados, com cavidades que apresentam elevada afinidade e seletividade para um determinado composto (Haupt, 2003).

Esta tese foi realizada em colaboração com um projeto de doutoramento em curso do Mestre Leandro Figueiredo, LEPABE. Aplicando os conhecimentos adquiridos pelo Leandro no desenvolvimento de um polímero para a análise da melamina em produtos alimentares, pretendeu-se com este projeto dar os primeiros passos no desenvolvimento de um polímero impresso molecularmente seletivo para o *musk galaxolide*.

2 Introdução

2.1 Organização da Tese

Esta tese encontra-se dividida em várias secções. Na Introdução é realizada uma abordagem aos *musks*, focando essencialmente os *musks* policíclicos e o *galaxolide*. Ainda nesta secção é explorada a tecnologia de impressão molecular e os polímeros impressos molecularmente. No final é feita uma pequena descrição do que é a cromatografia líquida de alta eficiência. Na terceira secção, Estado da Arte, é apresentada uma breve descrição dos estudos encontrados atualmente com a aplicação de polímeros impressos molecularmente a *musks*. Na secção 4, Descrição Técnica, são apresentados os equipamentos, reagentes e procedimentos utilizados ao longo deste projeto. Na secção 5, de Resultados e Discussão, são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo deste trabalho desde a validação do método analítico à avaliação de diversos parâmetros referentes ao polímero sintetizado. As principais conclusões deste trabalho são apresentadas na secção 6, seguidas das limitações e sugestões de trabalho futuro, na secção 7.

2.2 *Musks* e o *galaxolide*. A sua problemática.

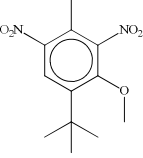
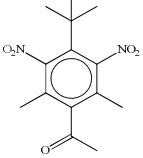
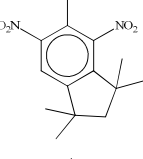
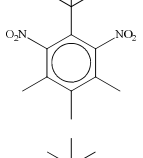
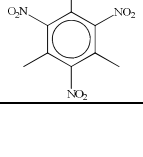
Os *musks* são uma classe de compostos orgânicos presentes nos produtos de cuidado e higiene pessoal como perfumes, cremes hidratantes, sabões, desodorizantes e produtos de higiene doméstica, como detergentes. São utilizados devido ao seu agradável odor e como fixadores de fragâncias, ajudando a manter os odores característicos deste tipo de produtos. Podem ser de origem natural ou sintética e possuem uma grande variedade de estruturas químicas.

Até ao final do séc. XIX, *musks* naturais eram utilizados extensivamente na área da perfumaria. Os *musks* naturais eram essencialmente de origem animal e eram obtidos principalmente a partir da glândula exócrina do cervo-almiscarado (*Moschus moschiferus*). A elevada demanda destes compostos por parte da indústria levou quase à extinção das espécies que lhe davam origem. A questão ética aliada aos elevados custos associados e a incerteza de garantia no fornecimento levou ao desenvolvimento de *musks* sintéticos (Sommer, 2004, Lu *et al.*, 2011).

Atendendo às suas características físico-químicas os *musks* sintéticos podem ser organizados em quatro grupos diferentes: nitro *musks*, *musks* policíclicos, *musks* macrocíclicos e *musks* alicíclicos.

Os nitro *musks* marcaram a origem dos *musks* sintéticos. Surgiram no ano de 1888 quando Albert Baur sintetizou pela primeira vez o *musk moskene* (Pickthall, 1960). Dentro deste grupo estão também presentes *musks* como o *musk tibetene*, *musk xylene* (MX), *musk ketone* (MK) e *musk ambrette*. O mercado de fixadores sintéticos foi liderado pelos nitro *musks* durante vários anos. A sua utilização diminuiu significativamente na década de 90 com a descoberta de propriedades bioacumulativas do *musk ketone* e *musk xylene* e reações fotoalérgicas causadas pelo *musk ambrette*. Os principais nitro *musks* e algumas das suas propriedades estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos nitro *musks* (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013).

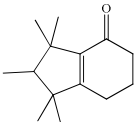
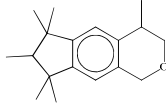
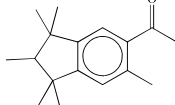
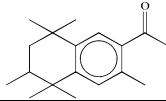
	Número CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Ponto Ebulição normal (°C)	Log K _{ow}	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
Musk ambrette	83-66-9	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₅		268,3	369	5,7	1,67
Musk ketone	81-14-1	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅		294,3	395	4,3	1,90
Musk moskene	116-66-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄		278,3	351	5,8	0,17
Musk tibetene	145-39-1	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄		266,3	391	5,9	0,29
Musk xylene	81-15-2	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₆		297,2	392	4,9	0,49

Paralelamente um outro grupo foi ganhando expressão no mercado, com custos de produção inferiores e maior resistência à luz e a soluções alcalinas, os *musks* policíclicos. Os principais *musks* pertencentes a este grupo são: *galaxolide* (HHCB), *tonalide* (AHTN), *cashmeran* e *phantolide*. A preocupação à volta deste grupo surgiu quando em 1999 foi detetada a sua presença em águas superficiais, peixes e tecidos humanos. Isto deve-se à sua elevada afinidade lipofílica e estabilidade química. No entanto estes são ainda os compostos mais utilizados (Roosens *et al.*, 2007). Atualmente o HHCB e AHTN dominam o mercado dos

musks policíclicos tendo o AHTN verificado uma grande redução de consumo na última década.

O impacto ambiental e toxicológico dos *musks* nitro e policíclicos é ainda hoje pouco claro apesar do crescente número de estudos neste campo (Abramsson-Zetterberg e Slanina, 2002). A Tabela 2 apresenta as principais características do *musks* policíclicos.

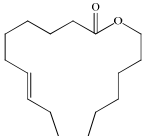
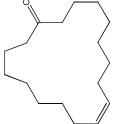
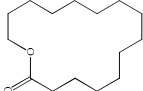
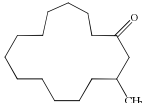
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos *musks* policíclicos (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013).

	Número CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Ponto ebulição normal (°C)	Log K _{ow}	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
<i>cashmeran</i> (DPMI)	33704-61-9	C ₁₄ H ₂₂ O		206,3	286	4,9	0,17
<i>galaxolide</i> (HHCB)	1222-05-5	C ₁₈ H ₂₆ O		258,4	326	5,9	1,75
<i>phantolide</i> (AHMI)	15323-35-0	C ₁₇ H ₂₄ O		244,4	337	6,7	0,03
<i>Musk tonalide</i> (AHTN)	1506-02-1	C ₁₈ H ₂₆ O		258,4	357	5,7	1,25

Os *musks* macrocíclicos foram introduzidos mais recentemente no mercado e possuem vantagens em relação aos policíclicos, embora tenham custos de produção mais elevados. Provavelmente por esta razão representam apenas uma pequena parte do mercado (3 a 4%) (Abramsson-Zetterberg e Slanina, 2002). Com odores mais intensos, a quantidade necessária para atingir a mesma performance a nível de perfumaria acaba por ser menor o que traz vantagens também a nível ambiental. Por outro lado estes compostos são mais facilmente degradados no meio ambiente (Bester, 2009).

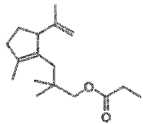
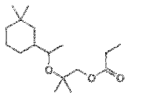
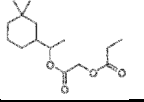
São essencialmente utilizados nos perfumes e reconhecidos por possuírem uma grande capacidade fixativa (Abramsson-Zetterberg e Slanina, 2002). *Musk ambrettolide*, *civetone*, *exaltolide* e *muscone* são exemplos deste grupo. A Tabela 3 mostra algumas das suas propriedades físico-químicas.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos musks macrocíclicos (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013).

	Número CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Ponto ebulição normal(°C)	Log K _{OW}	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
Musk ambrettolide	123-69-3	C ₁₆ H ₂₈ O ₂		252,4	286	5,4	0,59
Musk civetone	542-46-1	C ₁₇ H ₃₀ O		250,4	308-309	6,3	0,10
Musk exaltolide (thibetolide)	106-02-5	C ₁₆ H ₂₈ O ₂		252,4	379	6,0	0,15
Musk muscone	541-91-3	C ₁₆ H ₃₀ O		238,4	330	6,0	0,22

Musks alicíclicos, anteriormente denominados por *musks* lineares, são uma classe relativamente nova deste tipo de compostos. O primeiro a ser produzido foi o *cyclomusk*, 1975, mas só na década de 90 é que foram introduzidos comercialmente, através do *helvetolide*. O *romandolide* foi introduzido no mercado dez anos mais tarde. Estes compostos diferem dos anteriores por apresentarem uma estrutura linear (Eh, 2004; Kraft, 2004). Na Tabela 4 são apresentadas algumas das suas propriedades.

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas dos musks alicíclicos (Zhejiang NetSun Co., Ltd., 2013).

	Número CAS	Fórmula molecular	Estrutura molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Ponto ebulição normal(°C)	Log K _{OW}	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
Musk cyclomusk	84012-64-6	C ₁₇ H ₂₈ O ₂		264,4	337	6,7	0,03
Musk helvetolide	141773-73-1	C ₁₇ H ₃₂ O ₃		284,4	346	5,5	0,30
Musk romandolide	236391-76-7	C ₁₅ H ₂₆ O ₄		270,4	308	6,7	0,01

Devido à sua baixa polaridade, persistência química e natureza lipofílica estes compostos têm tendência a acumular-se no meio ambiente (Heberer, 2002).

No final dos anos 80 foram dadas provas de que estes compostos estavam presentes no meio ambiente como consequência da sua vasta utilização e remoção incompleta por parte das estações de tratamento de águas residuais (ETAR's). Por esta razão os nitro *musks* como o *musk xylene*, *musk ketone* e *musks* policíclicos como o *tonalide* e o *galaxolide* tornaram-se de grande interesse em termos de estudos ambientais e são hoje reconhecidos como importantes contaminantes do meio ambiente (Bester, 2009).

Nos anos 90 foram identificados vários *musks* policíclicos em águas residuais, águas superficiais e em peixes. Estudos feitos mais tarde em diversos países como Itália, Noruega, Espanha, Reino Unido e Estados Unidos identificaram estas substâncias nas matrizes já referidas e ainda em sedimentos, partículas suspensas e lamas provenientes do tratamento de águas. Também foram detetados *musks* policíclicos em tecido adiposo e amostras de leite humano. Estes compostos entram no organismo humano essencialmente por via dérmica (através de produtos de higiene pessoal ou roupa), sendo a ingestão de produtos alimentares contaminados, como peixe, pouco significativa (Heberer, 2002).

A capacidade de remoção destes compostos nas ETAR's foi já tema de vários estudos. Um deles, feito nos Estados Unidos (Simonich *et al.*, 2000), reportou taxas de remoção de 87,4% e 86,2% para *galaxolide* e *tonalide*, respetivamente, o que leva a um aumento progressivo da concentração destes contaminantes em águas superficiais. Por outro lado características comuns entre *musks* policíclicos são o seu comportamento hidrofóbico e a baixa solubilidade em água pelo que estes compostos acabam por sorver preferencialmente em matéria orgânica e lípidos. Por esta razão têm grande tendência a acumular-se nas lamas provenientes do tratamento de águas. Um estudo feito na Alemanha permite comparar concentrações detetadas entre HHCB e AHTN, 8,26 e 3,56 mg.kg⁻¹ massa seca, respetivamente (Heberer, 2002). Mais estudos feitos nesta área (Herren e Berset, 2000, Stevens *et al.*, 2002) permitem concluir que as concentrações médias de diversos *musks* policíclicos são semelhantes em diversos países da Europa e que o *galaxolide* foi sempre detetado em concentrações superiores em relação aos seus congéneres.

Um estudo feito em relação ao tempo de vida atmosférico do *galaxolide* conclui que este não é suficiente para que ocorra transporte ao longo de distâncias significativas (Aschmann *et al.*, 2001). Este estudo foca-se no *galaxolide*, sobretudo devido ao facto de ser utilizado em quantidades muito superiores aos restantes *musks* sintéticos.

No ano de 1996 foram produzidos cerca de 6000 toneladas de *musks* policíclicos a nível mundial, representando aproximadamente 85% da produção global de *musks* sintéticos (Heberer, 2002).

O *galaxolide* e o *tonalide* são os dois mais consumidos representando 95% do mercado europeu e 90% nos EUA, a nível de *musks* policíclicos (HERA, 2004).

Em 1998 o consumo anual de *galaxolide* na UE foi cerca de 1472 toneladas, quatro vezes superior ao de *tonalide*, o segundo mais consumido. Os restantes *musks* policíclicos apresentaram todos valores abaixo das 20 toneladas por ano. Em termos de nitro *musks* apenas 40 toneladas de *musk ketone* e 86 toneladas de *musk xylene* foram consumidos (Heberer, 2002). Em 2000, na europa, foram consumidas 1427 toneladas de *galaxolide* e 358 toneladas de *tonalide* (HERA, 2004) e em 2004, 1307 toneladas de *galaxolide* (EU-RAR, 2008). Não foram encontrados dados referentes ao consumo de AHTN em 2004. Começa a verificar-se um decréscimo na utilização destes *musks*, como elucida a Figura 1. Os esforços, especialmente na indústria de detergentes, para reduzir a quantidade de *musks* policíclicos nos seus produtos propiciam um decréscimo das suas concentrações no meio ambiente.

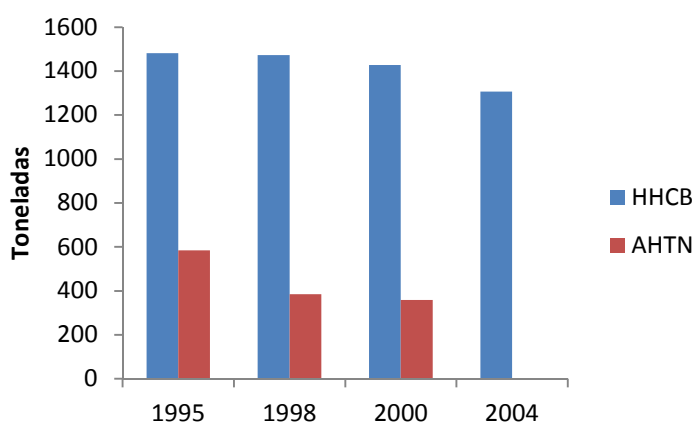


Figura 1 - Consumo de HHCB e AHTN na europa, em toneladas (adaptado de HERA, 2004; EU-RAR, 2008).

Um estudo feito em 2008 analisou a distribuição de 6 *musks* policíclicos e 2 nitro *musks* em 31 artigos domésticos essenciais. Os resultados indicam que a maior parte destes produtos contêm *musks*. O *galaxolide* (HHCB) foi detetado em 61% dos produtos analisados e o AHTN em 36%. Já o *musk ketone* e o *musk xylene* foram encontrados em 16% e 6%, respetivamente (Figura 2). Embora a distribuição destes compostos varie conforme os produtos analisados, os resultados estão em conformidade com a mais elevada produção de HHCB e AHTN na indústria de fragâncias. As maiores concentrações de HHCB foram encontradas em perfumes enquanto o AHTN teve a sua maior concentração em champôs. O uso diário de produtos de higiene pessoal e doméstica como champôs, géis de banho, perfumes, sabões e detergentes acaba por levar à sua descarga no sistema de esgotos sendo por isso a maior fonte de *musks* nas estações de tratamento de águas residuais (Zhang *et al.*, 2008).

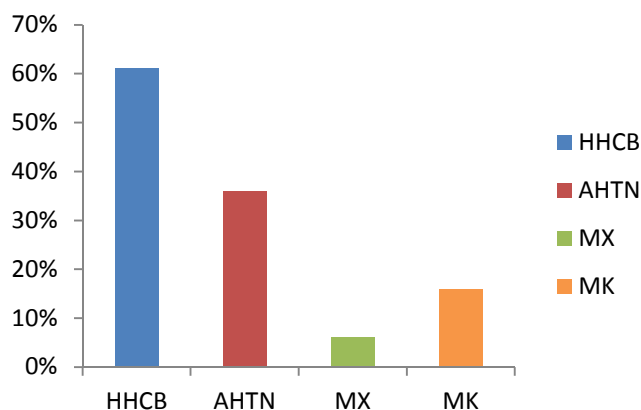


Figura 2 - Distribuição de musks sintéticos em artigos domésticos segundo o estudo de 2008. (adaptado de Zhang *et al.*, 2008).

Foram também feitos vários estudos toxicológicos e análises de risco humano e ambiental nos últimos anos para avaliar o possível impacto destas substâncias no ser humano e no ambiente. Os *musks* policíclicos em geral apresentam baixa toxicidade sistêmica e nenhum potencial genotóxico. Fromme *et al.* (2001) concluíram que a exposição humana por absorção dérmica, maioritariamente pela responsabilidade do próprio indivíduo, associada ao uso de produtos de cuidado pessoal será sempre muito superior à exposição indireta devida à sua presença no meio ambiente. Ainda assim nenhum dos dois tipos de exposição representará risco significativo para a saúde humana (Balk e Ford, 1999). Segundo Heberer (2002) a informação existente derivada dos estudos de análise de risco, o risco para humanos e outros consumidores de peixe pode ser praticamente excluído.

Apesar dos pareceres favoráveis em relação ao risco para a saúde humana estudos mais recentes sugerem que o *galaxolide* pode atuar negativamente a nível do sistema endócrino (Schreurs *et al.*, 2004, Gomez *et al.*, 2005, Schreurs *et al.*, 2005, Schreurs *et al.*, 2005). Outro estudo realizado em mexilhão marinho concluiu que a exposição ao *galaxolide* pode afetar as defesas dos organismos debilitando os componentes responsáveis pela defesa contra compostos xenobióticos (Luckenbach e Epel, 2005). (Breitholtz *et al.*, 2003) e (Wollenberger *et al.*, 2003) concluíram também quanto às capacidades inibidoras do *galaxolide* no desenvolvimento de pequenas espécies de crustáceos indicando que se trata de um composto tóxico para algumas espécies aquáticas.

Apesar das análises de risco não reportarem efeitos negativos a nível toxicológico ou dermatológico a extensa utilização, estabilidade química e baixa biodegradabilidade fazem destes compostos potenciais contaminantes do meio ambiente devido ao seu fator de bioacumulação (Daughton e Ternes, 1999).

2.3 Tecnologia de Impressão Molecular

A impressão molecular é uma técnica baseada no conceito de interações biomoleculares (p.ex. antigénio-anticorpo, enzima-substrato, fármaco-recetor) em que a partir de uma molécula modelo (*template*) se sintetiza uma estrutura rígida tridimensional (polímero) com cavidades que possuem afinidade para com esse *template*. No fundo imprime-se uma “memória” na fase de produção do polímero, que passa a ter cavidades complementares em forma, tamanho e posição dos grupos funcionais a essa molécula modelo permitindo criar um efeito de reconhecimento molecular. Estes polímeros são denominados por polímeros impressos molecularmente, ou em inglês, *molecularly imprinted polymers* (MIP) (Pichon e Chapuis-Hugon, 2008) (Tarley *et al.*, 2005).

A síntese química destes polímeros consiste na reação entre a molécula *template* e moléculas de um monómero funcional, que interagem por meio de ligações covalentes ou não-covalentes (complexação). Os complexos formados são posteriormente polimerizados por meio de um agente que promove ligações cruzadas (*cross-linker*), permitindo formar assim um polímero rígido. Esta reação de polimerização é iniciada após a adição de um iniciador radicalar e a mistura de polimerização possui, geralmente, um solvente que induz a formação de poros no polímero (solvente porogénico). Após a formação do polímero as moléculas *template* são removidas por processos de lavagem (p.ex. extração com solventes), quebrando as ligações entre o *template* e a matriz do polímero e dando origem às cavidades específicas. Estas conferem ao MIP a capacidade de reconhecer e reter seletivamente a molécula inicial, presente numa qualquer amostra complexa, a partir do mesmo tipo de interações *template*-monómero. Na Figura 3 está representado o esquema do processo de formação de um MIP.

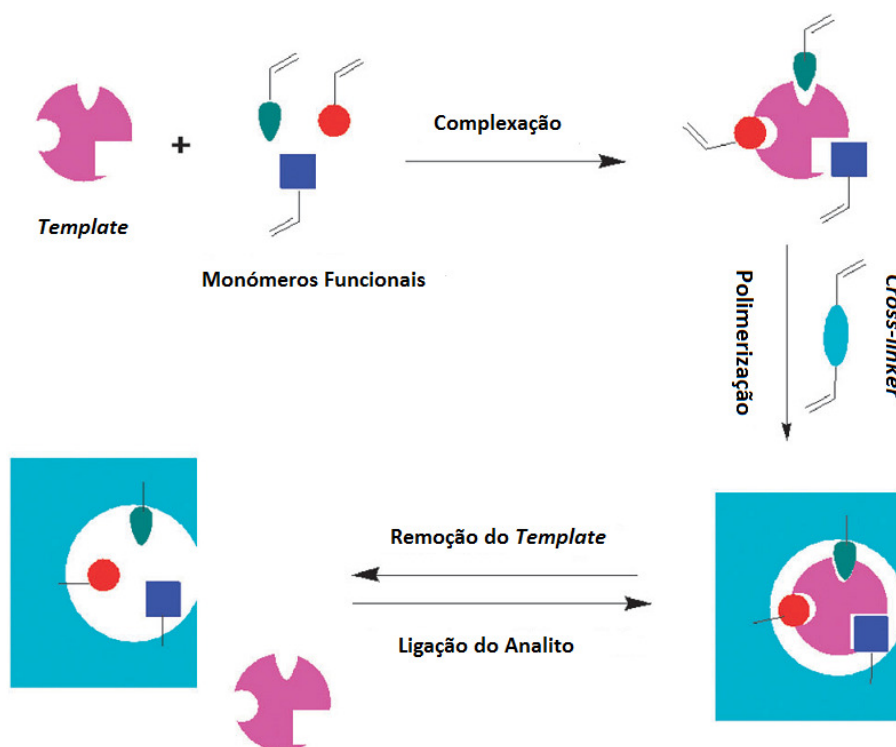


Figura 3 - Representação esquemática do processo de formação de um MIP (adaptado de Chen et al 2011).

Embora o processo de produção seja relativamente simples, a escolha dos reagentes químicos bem como o procedimento a utilizar devem ser feitas com bastante prudência evitando que o polímero adquira características indesejáveis em termos de morfologia e uniformidade das partículas e respectivas cavidades seletivas. (Pichon e Chapuis-Hugon, 2008) (Chen et al., 2011) (Haupt, 2003).

Os MIPs são reconhecidos pela sua estabilidade química, facilidade de preparação, capacidade de adsorção e custos reduzidos para a maior parte dos compostos que se pretendam analisar (analito), o que os torna atrativos para uma variedade de aplicações em diversas áreas científicas (Pichon e Chapuis-Hugon, 2008). Têm sido maioritariamente utilizados na preparação de amostras para análises ambientais, biomédicas e alimentares atuando em processos de extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME). São também aplicados a fases estacionárias utilizadas em colunas cromatográficas, nomeadamente em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese capilar (CE) e cromatografia em camada fina (TLC). Outros estudos demonstram a sua utilização em sistemas de libertação controlada de fármacos, sensores químicos, biossensores e em reações catalíticas (Figueiredo et al., 2008) (Haupt, 2003) (Vasapollo et al., 2011).

A tecnologia de impressão molecular tem sido alvo de variados estudos ao longo dos últimos anos levando a um desenvolvimento significativo da sua performance. O baixo custo

inerente à produção, a boa estabilidade que apresentam em condições físico-químicas agressivas e a capacidade de reutilização faz dos MIPs um material sintético de reconhecimento molecular promissor em diversas áreas científicas (Vasapollo *et al.*, 2011).

Por outro lado a tecnologia de impressão molecular também pode ter associados alguns problemas como por exemplo o vazamento (do inglês *bleeding*) da molécula *template* caso esta não seja completamente extraída do polímero, o que pode interferir com os resultados de análises. Outros problemas reportados incluem a possibilidade de existir incompatibilidade com meios aquosos, baixas capacidades de adsorção e lenta transferência de massa (Chen *et al.*, 2011).

2.3.1 Processo de formação do Complexo Monómero-*template*

Em impressão molecular a complexação entre a molécula *template* e os monómeros funcionais pode ocorrer, basicamente, de duas maneiras diferentes. Ou por ligações covalentes reversíveis ou envolvendo ligações não covalentes. Na estratégia covalente a molécula *template* liga-se aos monómeros por meio de ligações covalentes e mais tarde, aquando da sua aplicação, o processo de ligação do analito ao polímero irá ocorrer através deste mesmo tipo de ligações. Graças à boa estabilidade das ligações covalentes os polímeros formados com base neste tipo de ligações são geralmente mais seletivos dada a distribuição de cavidades mais homogênea. No entanto, este é um método considerado menos flexível uma vez que a formação de ligações idênticas no processo de ligação do analito requer interações covalentes rapidamente reversíveis entre o monómero e o *template*. Por esta razão os *templates* adequados para este tipo de impressão são limitados. Por outro lado tem sido verificado que polímeros preparados desta forma apresentam uma cinética lenta de retenção do analito às cavidades do polímero. Este tipo de restrições não existe na impressão molecular através de ligações não covalentes. Nesta abordagem as ligações podem ser do tipo pontes de hidrogénio, ligações iónicas, forças de *van der Waals*, etc. e, novamente, após a dissociação da molécula modelo, o analito ligar-se-á à matriz do polímero por meio das mesmas ligações que lhe deram origem. Embora este tipo seja caracterizado por diâmetros de partículas e cavidades seletivas menos uniformes, a maior flexibilidade de escolha associada ao conjunto monómero-*template* bem como menor restrição a nível cinético na ligação dos analitos faz deste tipo de impressão o mais utilizado atualmente. É importante notar que existe também uma abordagem semi-covalente, em que o processo de complexação ocorre por meio de ligações covalentes mas a ligação posterior do analito à matriz polimérica se dá através de ligações não-covalentes. Este método partilha a vantagens da impressão covalente no processo de formação e das ligações não-covalentes no processo de retenção (Tarley *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2011).

2.3.2 Reagentes e condições utilizados em Impressão Molecular

A reação de polimerização é um processo bastante complexo que é afetado por uma diversidade de fatores entre os quais a concentração do monómero, do *cross-linker* e do iniciador, a temperatura, tempo de polimerização, presença ou não de um campo magnético e volume da mistura de polimerização. Para se obter um bom polímero é necessário otimizar uma grande variedade de fatores, o que torna a síntese de MIPs um processo lento e moroso (Chen *et al.*, 2011).

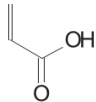
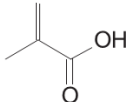
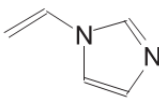
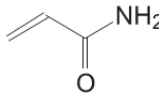
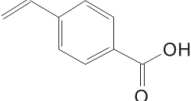
A seleção dos reagentes apropriados é um passo muito importante no processo de impressão molecular.

Geralmente as moléculas *template* são os próprios compostos que se pretendem analisar mas nem sempre esta é a melhor opção devido a fatores como o referido *bleeding* da molécula modelo caso esta não seja completamente removida no processo de extração. O *template* deverá ser capaz de criar ligações com o monómero funcional pois caso contrário não haverá impressão. Não deverá possuir grupos que acelerem ou retardem o processo de polimerização nem grupos polimerizáveis que o fixem à matriz do polímero (Figueiredo *et al.*, 2008).

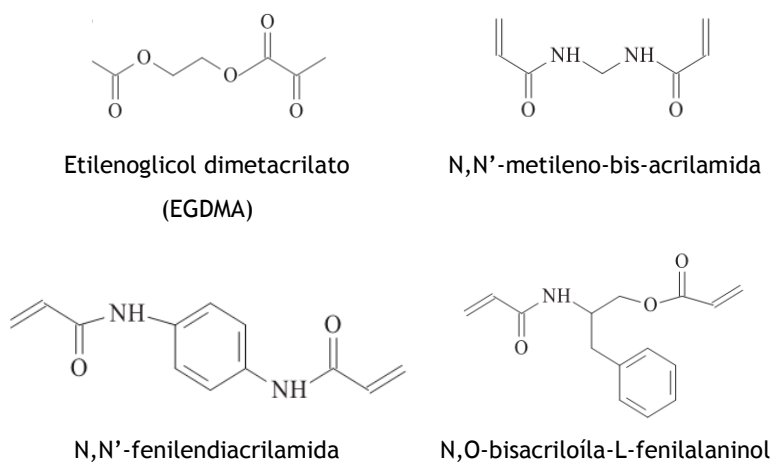
A função do monómero é fornecer grupos funcionais que permitam formar um complexo com o *template* através das reações já referidas. A força das ligações entre o *template* e o monómero afeta a afinidade do MIP e definem a respetiva seletividade das cavidades. Alguns dos monómeros funcionais mais utilizados estão representados na Tabela 5. O ácido metacrílico (MAA) tem sido usado como um monómero universal devido à sua boa apetência para ligações de hidrogénio e ligações iónicas (Chen *et al.*, 2011).

O monómero funcional deve estar presente na mistura sempre em quantidade superior ao *template* de forma a garantir a formação do maior número possível de cavidades específicas. No entanto, a razão molar entre estes dois componentes deve ser bem estudada pois quantidades muito superiores de monómero terão como consequência a formação de cavidades não específicas (Figueiredo *et al.*, 2008).

Tabela 5 - Exemplo de alguns monómeros utilizados em MIP e respectivos tipos de ligações/interações (adaptado de Tarley et al., 2005).

Mómonero funcional	Estrutura molecular	Tipo de ligação com o analito
Ácido acrílico		Iônica ou pontes de hidrogénio
Ácido metacrílico (MAA)		Iônica ou pontes de hidrogénio
1-Vinilimidazol		Iônica ou pontes de hidrogénio e coordenação de metais
Acrilamida		Pontes de hidrogénio
Ácido p-vinilbenzóico		Iônica ou pontes de hidrogénio

A função do *cross-linker* é fixar grupos de monómeros funcionais numa matriz rígida por meio de ligações cruzadas à volta da molécula impressa permitindo assim ao polímero manter-se intacto após a remoção dessa mesma molécula. O tipo e a quantidade de *cross-linker* têm também influência na seletividade e capacidade fixativa do MIP. Desta forma este deverá estar presente em concentrações superiores às do monómero de forma a garantir a porosidade do polímero. O etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) é dos *cross-linkers* mais utilizados devido à sua capacidade de formar polímeros térmica e mecanicamente estáveis. A Figura 4 apresenta as estruturas de alguns dos agentes mais utilizados (Figueiredo *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2011).

Figura 4 - Estrutura molecular de alguns *cross-linkers* utilizados em MIPs (adaptado de Tarley et al., 2005).

O solvente porogénico tem um papel importante no processo de impressão molecular. Tanto o solvente utilizado como o respetivo volume têm influência sobre a formação do complexo monómero-*template*. O solvente fornece um meio para dissolução dos reagentes e é responsável pela criação dos poros nos polímeros. A utilização de solventes apolares como clorofórmio, tolueno, ou acetonitrilo é mais frequente pois solventes polares como água ou metanol atuam como competidores no meio reacional interferindo na formação de ligações de hidrogénio ou ligações iónicas. De um modo geral pretende-se um solvente que não interfira na ligação monómero-*template* e que garanta uma morfologia adequada do polímero (Tarley *et al.*, 2005, Vasapollo *et al.*, 2011).

A função do iniciador radicalar é criar radicais livres de forma a possibilitar o início e a manutenção da reação de polimerização. O início da reação necessita também de um estímulo físico como o aumento da temperatura ou a incidência de radiação ultravioleta (UV). A utilização da radiação UV permite obter tempos de polimerização bastante inferiores no entanto é necessário ter em conta a fotossensibilidade dos restantes reagentes. O iniciador mais comumente utilizado é o 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) (Figueiredo *et al.*, 2008).

A remoção do oxigénio presente no ambiente de síntese do polímero é um passo importante a ter em conta pois este leva à formação de um excesso de radicais que é prejudicial ao processo de polimerização. Esta remoção pode ser efetuada saturando o meio com azoto ou árgon ou ainda através de ultrassons (Figueiredo *et al.*, 2008).

2.3.3 Métodos de polimerização

O primeiro método de polimerização utilizado na síntese de polímeros impressos molecularmente foi baseado na polimerização em *bulk*. Este é o método mais comumente utilizado em impressão molecular devido à sua simplicidade. É usado exclusivamente com solventes orgânicos e consiste basicamente na mistura de todos os componentes (*template*, monómero, solvente e iniciador) e respetiva polimerização. No final obtém-se um bloco polimérico que passará por uma fase de moagem de forma a obter partículas mais pequenas, no entanto, de tamanho e forma irregulares. As partículas obtidas possuem geralmente diâmetros entre 20 e 50 µm. A grande desvantagem é que grande parte do polímero produzido acaba por ser perdida durante a fase de trituração (cerca de 50%). Para além disto os MIPs sintetizados por este método são geralmente caracterizados por matrizes muito heterogéneas, que advêm da falta de controlo sobre o processo de polimerização (Pérez-Moral e Mayes, 2004, Tarley *et al.*, 2005).

Outro método aplicado é o de polimerização por suspensão. Neste método a polimerização ocorre dentro de gotas de monómero dispersas num solvente imiscível. A primeira etapa consiste em solubilizar todos os reagentes num solvente orgânico apolar

(solvente porogénico). A mistura é depois dispersa com a adição do solvente imiscível criando uma emulsão. Como solvente dispersivo é geralmente utilizada água. À mistura é ainda adicionado um agente tensioativo que adsorve como uma camada fina à volta das gotas dos monómeros prevenindo a sua coalescência. Estes compostos são geralmente polímeros orgânicos solúveis em água como é o caso do álcool polivinílico. O meio reacional é agitado e mantido em banho-maria à temperatura desejada durante todo o processo. Dependendo da agitação e da quantidade de tensioativo adicionado o diâmetro das partículas pode variar entre 5 e 50 μm . Em comparação com o método *bulk* as partículas formadas apresentam tamanhos mais uniformes. As partículas de polímero obtidas são geralmente separadas da fase imiscível com facilidade (Pérez-Moral e Mayes, 2004, Tarley *et al.*, 2005).

O método de polimerização por precipitação é análogo ao método de polimerização em *bulk* sendo, no entanto, utilizados volumes superiores de solvente porogénico (2 a 10 vezes) o que impede a formação de uma massa polimérica sólida. Neste caso à medida que a polimerização ocorre as cadeias crescentes de polímero vão-se tornando insolúveis no solvente orgânico e acabam por precipitar. A rigidez proporcionada pelo *cross-linker* é suficiente para impedir as partículas de coalescer não sendo necessária a adição de nenhum agente estabilizador. Este método permite obter partículas com tamanhos uniformes e diâmetros tipicamente inferiores a 0,1 μm . Uma vez que não é necessária a fase de moagem este método tem rendimentos superiores em relação à polimerização em *bulk* (Pérez-Moral e Mayes, 2004, Tarley *et al.*, 2005, Pichon e Chapuis-Hugon, 2008).

Outros métodos empregados na polimerização de MIPs incluem a polimerização em passos múltiplos, do inglês *multi-step*. Esta envolve a aplicação de partículas poliméricas de diâmetro bem definido (geralmente de poliestireno e diâmetro 1 μm) que passam por diversas etapas de expansão com a mistura reacional (monómero funcional, *template*, iniciador, *cross-linker*, solvente). Permite obter partículas monodispersas com tamanhos que podem variar entre 2 e 50 μm . Apesar de permitir um bom controlo sob o tamanho final e o número de partículas este é, de entre todos os métodos aplicados, o mais trabalhoso. Um outro método consiste em polimerização no interior de materiais porosos como sílicas. A reação ocorre dentro dos poros do material que ficam assim seletivos para a molécula modelo empregada (Pérez-Moral e Mayes, 2004, Tarley *et al.*, 2005).

2.3.4 Caracterização de MIPs

Após a síntese e a extração da molécula modelo a caracterização é uma etapa bastante importante que permite obter informação característica do polímero produzido. É usualmente realizada uma caracterização química, morfológica e em relação à capacidade de ligação do analito (Cormack e Elorza, 2004).

A caracterização morfológica envolve geralmente a observação microscópica da superfície do polímero e a avaliação da sua porosidade.

A microscopia por varrimento eletrónico permite obter uma imagem superficial das partículas do polímero e avaliar a presença de cavidades superficiais. A microscopia de força atómica permite obter um perfil tridimensional da superfície do polímero (Cormack e Elorza, 2004, Gore *et al.*, 2004).

A avaliação da porosidade pode ser feita por porosimetria de mercúrio ou azoto e proporciona informação como a distribuição do tamanho dos poros e o seu diâmetro médio (Cormack e Elorza, 2004).

A caracterização química pode envolver microanálise elementar (de carbono, hidrogénio, azoto, cloro, etc.) e espectroscopia de infravermelho ou UV-Vis, que permite obter informação acerca do grau de polimerização, dos grupos funcionais presentes no polímero e a relação estequiométrica entre o monómero funcional e a molécula modelo (Ye *et al.*, 2000, Cormack e Elorza, 2004).

O estudo das cavidades seletivas do polímero permite avaliar a capacidade de interação com analito e é feita através de ensaios de adsorção. O método descrito na literatura consiste em ensaios de ligação em *batch* como está representado na Figura 5.

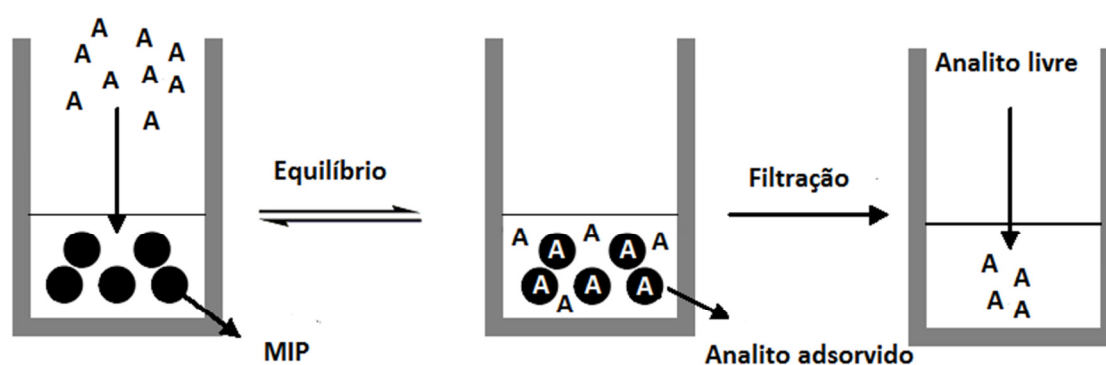


Figura 5 - Ensaio de adsorção (adaptado de Kim, 2004).

Neste método uma quantidade definida de MIP é posta em contacto com uma solução de concentração conhecida da molécula analito. Ao fim de determinado tempo a solução é analisada permitindo saber a quantidade de analito que ficou retido no polímero (Kim, 2004, Umpleby li *et al.*, 2004).

Este procedimento foi utilizado para estudar a influência do solvente na adsorção do *galaxolide*.

Este tipo de ensaios é geralmente feito em paralelo com um polímero não impresso (NIP), também conhecido como polímero de referência. Este polímero é sintetizado sem adição de *template*, resultando num polímero com as mesmas propriedades químicas que o MIP mas sem as cavidades específicas. Desta forma espera-se que a força das interações NIP-analito seja menor em relação ao MIP uma vez que existem menos pontos de ligação. A comparação entre as capacidades adsorptivas de cada um pode ser realizada pelo cálculo de um *imprinting factor* (IF) (Pichon e Chapuis-Hugon, 2008).

2.4 Método de análise do *galaxolide*

2.4.1 Quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

De forma a avaliar a quantidade de *galaxolide* nas amostras ao longo do projeto, foi necessário utilizar um método analítico desenvolvido anteriormente no LEPABE (Correia *et al.*, 2013) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência (FL).

A cromatografia é um método físico de separação e análise de substâncias numa mistura em que os componentes são separados pela interação entre uma fase móvel e uma fase estacionária. A amostra é introduzida num injetor e arrastada pela fase móvel ou eluente através de uma coluna cromatográfica (fase estacionária). Conforme a afinidade dos componentes da amostra para a fase estacionária estes ficam retidos durante tempos diferentes permitindo assim a sua separação. À saída da coluna o detetor proporciona uma identificação e quantificação contínua dos componentes da mistura. O gráfico de resposta do detetor em função do tempo de retenção tem o nome de cromatograma.

A Figura 6 representa esquematicamente os constituintes de um sistema HPLC.

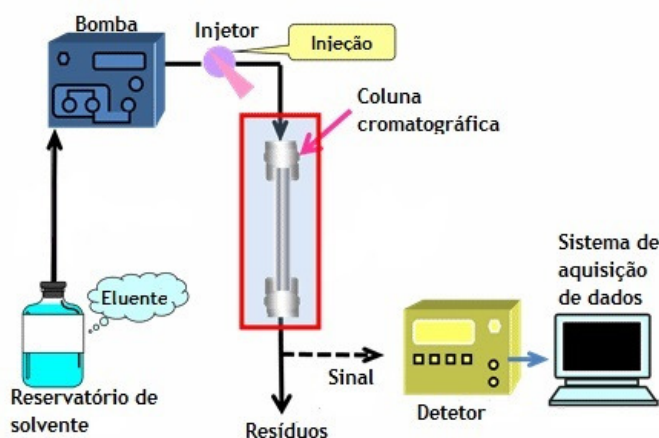


Figura 6 - Constituintes de um sistema HPLC.

Em cromatografia líquida de alta eficiência a utilização de colunas fechadas contendo partículas muito finas proporciona separações muito eficientes e a utilização de altas pressões na injeção da fase móvel permite obter tempos de análise reduzidos em relação à cromatografia líquida clássica.

2.4.2 Detecção por fluorescência (FL)

Os detetores de fluorescência são dos detetores mais sensíveis em HPLC. A detecção por fluorescência é adequada na análise de concentrações vestigiais devido à sua elevada sensibilidade e seletividade. A seletividade associada pode ser uma vantagem uma vez que reduz a interferência de outros compostos, no entanto este fator limita também o número de compostos que podem ser analisados por este método. Este facto é geralmente contornado por processos de derivatização, em que uma substância é transformada em outra de estrutura semelhante. Os detetores de fluorescência baseiam-se no princípio de que alguns compostos absorvem a radiação UV a um determinado comprimento de onda e de seguida emitem essa radiação (fluorescência) num comprimento de onda diferente. Neste fenómeno, uma substância absorve a radiação incidente atingindo um nível de energia superior e em seguida liberta essa radiação de forma a voltar ao nível de energia original. Tal substância tem comprimentos de onda específicos de excitação e de emissão. Num detetor de fluorescência a radiação de excitação é detetada numa direção ortogonal à radiação de emissão (Vickrey, 1983, Scott, 1986).

3 Estado da Arte

Tanto quanto é do conhecimento dos autores não existem até à data estudos referentes à aplicação de MIPs ao *galaxolide* tanto como analito ou molécula *template*. Foi, no entanto, encontrado um estudo referente a nitro *musks* e outro referente a fluoroquinolonas com menção do *galaxolide*.

Lopez-Nogueroles *et al.* (2013) desenvolveram um método analítico para determinação de nitro *musks* em águas residuais e superficiais baseado na aplicação de sílicas impressas molecularmente como sorbente em processos de extração em fase sólida (SPE) utilizados em etapas de *clean-up*. Uma abordagem diferente ao processo de síntese aplicando uma polimerização sol-gel permitiu obter um material híbrido (inorgânico-orgânico) conhecido como sílica impressa molecularmente (MIS).

O processo de síntese da sílica foi baseado nos trabalhos de Lordel *et al.* (2011) utilizando 2,4-DNT como *template* uma vez que possui uma estrutura análoga aos nitro *musks*. Feniltrimetoxisilano (PTMS) e tetraetoxisilano (TEOS) foram utilizados como monómero funcional e *cross-linker*, respetivamente. O solvente foi uma solução comercial de amónia (32%).

As recuperações do método foram entre 61% e 87% em comparação com recuperações entre 8% e 26% para uma sílica não impressa.

Por sua vez, (Prieto *et al.*, 2011) desenvolveram um polímero impresso molecularmente pelo método de polimerização por precipitação utilizando ciprofloxacina (CIP) como *template* para a análise de fluoroquinolonas (FQs). MAA, EGDMA e metanol foram utilizados como monómero funcional, *cross-linker* e solvente porogénico, respetivamente. O MIP produzido foi aplicado a uma tecnologia denominada por MEPS (*microextraction by packed sorbent*) aliado a cromatografia líquida com espectrometria de massa (LC-MS) para análise de CIP, ofloxacina (OFLO) e norfloxacin (NOR) em amostras de águas residuais municipais. MEPS consiste numa técnica baseada em SPE. Com esta metodologia uma pequena quantidade de MIP é inserida num pequeno recipiente e acoplada à seringa, exigindo um menor consumo de solvente e amostra. O método MEPS aplicado foi também comparado com o SPE tradicional aliado ao MIP produzido (MISPE).

Os limites de deteção obtidos variaram entre 0,5 e 3,8 ng.L⁻¹ para o MEPS e entre 1,1 e 8,1 ng.L⁻¹ para o MISPE. As recuperações variaram entre 93 e 115% para a tecnologia MEPS e entre 87 e 92% para o MISPE.

Nada é referido em relação à tecnologia MEPS aplicada à análise de outros compostos, entre os quais o *galaxolide*.

Contudo é feita uma comparação da selectividade do MIP sintetizado com um sorbente comercial, sendo ambos aplicados à técnica de SPE. A análise de três amostras de águas residuais permitiu detetar concentrações de *galaxolide* superiores para o sorbente comercial (72,2 - 200,0 ng.mL⁻¹) relativamente ao MIP (3,9 ng.mL⁻¹). Pelo facto de o *galaxolide* não se tratar do composto alvo, a menor captação deste interferente por parte do MISPE permite concluir a boa seletividade do MIP para o analito (FQs).

4 Descrição Técnica

4.1 Reagentes

O *galaxolide* utilizado neste estudo foi adquirido à Sigma-Aldrich numa solução de 50% em dietilftalato (DEP).

O acetonitrilo utilizado na fase móvel e na produção do polímero foi adquirido com 99,9% de pureza à VWR. Junto da mesma empresa foi adquirido o metanol (100%) utilizado na preparação da solução mãe de *galaxolide* e no processo de extração do *template*.

Também na fase móvel do HPLC foi utilizada água destilada, filtrada, e ácido acético glacial (100%) comprado à Merck.

No processo de síntese do polímero foi utilizado ácido metacrílico (MAA) com 99% de pureza, etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) a 98%, álcool polivinílico hidrolisado (PVA) entre 86,7 e 88,7% e 2,2-azobis(2-metil-propionitrilo) (AIBN), 98% puro, todos provenientes da Sigma-Aldrich.

4.2 Instrumentação - HPLC-FL

A análise do *galaxolide* foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com um detetor de fluorescência (HPLC-FL). O equipamento trata-se de um Hitachi Elite LaChrom VWR (Darmstadt, Alemanha) equipado com uma bomba L-2130, um injetor automático L-2200, o respetivo sistema de deteção por fluorescência L-2480 e um sistema de recolha e tratamento de dados (EZChrom Elite Client/Server ver. 3.1.6). A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna C18 de fase reversa Purospher®STAR RP-18 *endcapped* (250 mm x 4 mm; 5 µm) juntamente com uma pré-coluna Purospher®STAR (4 mm x 4 mm; 5 µm), ambas da Merck (Darmstadt, Alemanha).

A fase móvel utilizada foi baseada em Correia *et al.* (2013) e consiste numa solução de acetonitrilo/água (80/20) acidificada com ácido acético glacial (17 mM).

A fase móvel, preparada com água previamente filtrada, foi levada a desgaseificar com hélio durante 15 minutos antes de ser utilizada. Para as análises foi utilizado um caudal de 1 mL.min⁻¹ mantido em modo isocrático. Antes de cada conjunto de injeções o equipamento foi purgado a um caudal de 10 mL.min⁻¹ para remoção do ar presente nas condutas, de modo a minimizar eventuais interferências. No início de utilização da coluna foi realizada uma sequência de estabilização com a fase móvel referida. No final de cada

utilização foi realizada uma sequência de lavagem com acetonitrilo/água (80/20) com o intuito de remover o ácido acético que pudesse ficar retido na coluna, a fim de evitar a sua degradação.

A injeção das soluções padrão bem como todas as amostras restantes foi realizada em duplicado. Em todos os casos o *software* do equipamento (HPLC) foi programado para injetar volumes de 99 µL tendo todas as análises sido realizadas à temperatura ambiente.

Os parâmetros de fluorescência utilizados na detecção, $\lambda_{\text{excitação}}$ e $\lambda_{\text{emissão}}$, foram respetivamente 280 nm e 310 nm, baseados em Correia *et al.* (2013).

Foram feitas corridas de 25 minutos tendo em conta que o tempo de retenção médio para o *galaxolide* foi de 16,8 minutos.

4.3 Preparação de padrões

A preparação dos padrões foi elaborada com base em Correia *et al.* (2013). Inicialmente foi preparada uma solução mãe de *galaxolide* em metanol de concentração aproximada 60 mg.L⁻¹ (69 mg.L⁻¹) num balão volumétrico de 100 mL. Para elaboração da reta de calibração foram preparados 11 padrões com concentrações entre 0,4 µg.L⁻¹ e 700 µg.L⁻¹. Os padrões de 10 e 11 (500 e 700 µg.L⁻¹) foram preparados em balões volumétricos de 10 mL a partir da solução mãe inicial diluída em acetonitrilo/água (80/20). O padrão 9 foi preparado num balão de 100 mL (também a partir da solução mãe) uma vez que serviu como solução intermédia para a preparação dos restantes padrões de concentração inferior. Os padrões de 1 a 8 com concentrações de 0,4, 1, 5, 10, 40, 80, 120 e 160 µg.L⁻¹, respetivamente, preparados em balões volumétricos de 10 mL, foram também diluídos em acetonitrilo/água (80/20). Com o objetivo de minimizar a degradação do composto todas as soluções foram protegidas da luz com folha de alumínio e armazenadas no frigorífico. Previamente à análise os padrões foram deixados aproximadamente uma hora à temperatura ambiente.

4.4 Síntese do MIP e do NIP

A metodologia de síntese do polímero foi adaptada de outra previamente desenvolvida no LEPABE (dados não publicados, Leandro Figueiredo, 2013) relativa à produção de um MIP para análise de melamina em produtos alimentares. O método baseia-se na polimerização por suspensão.

A reação ocorreu num balão de fundo redondo (250 mL), com dupla tubuladura, ligado a um condensador e com agitação por meio de barra magnética. Começou-se por pesar o *template* (*galaxolide*) diretamente para o balão, devido à sua dificuldade de manuseio. De seguida adicionou-se o monómero (MAA) e o solvente porogénico (acetonitrilo), deixando dissolver a mistura cerca de 1 a 2 minutos a 1600 rpm. De seguida foram adicionados o *cross-linker* (EGDMA), o iniciador (AIBN) e o tensoativo (PVA). Foram adicionados 50 mL de água destilada que atua como solvente de dispersão. A agitação foi mantida a 1600 rpm durante 10 minutos de forma a promover uma boa dispersão dos reagentes, ao mesmo tempo que se saturou a solução obtida com um leve caudal de azoto com o objetivo de remover qualquer oxigénio dissolvido na mistura. O balão foi mantido num banho de silicone a aproximadamente 60 °C deixando a reação ocorrer num período de 24 h a agitação moderada (600-700 rpm). Numa das tubuladuras foi inserido um termómetro enquanto a outra foi selada com uma rolha de borracha. A Figura 7 ilustra o ensaio de produção do polímero.

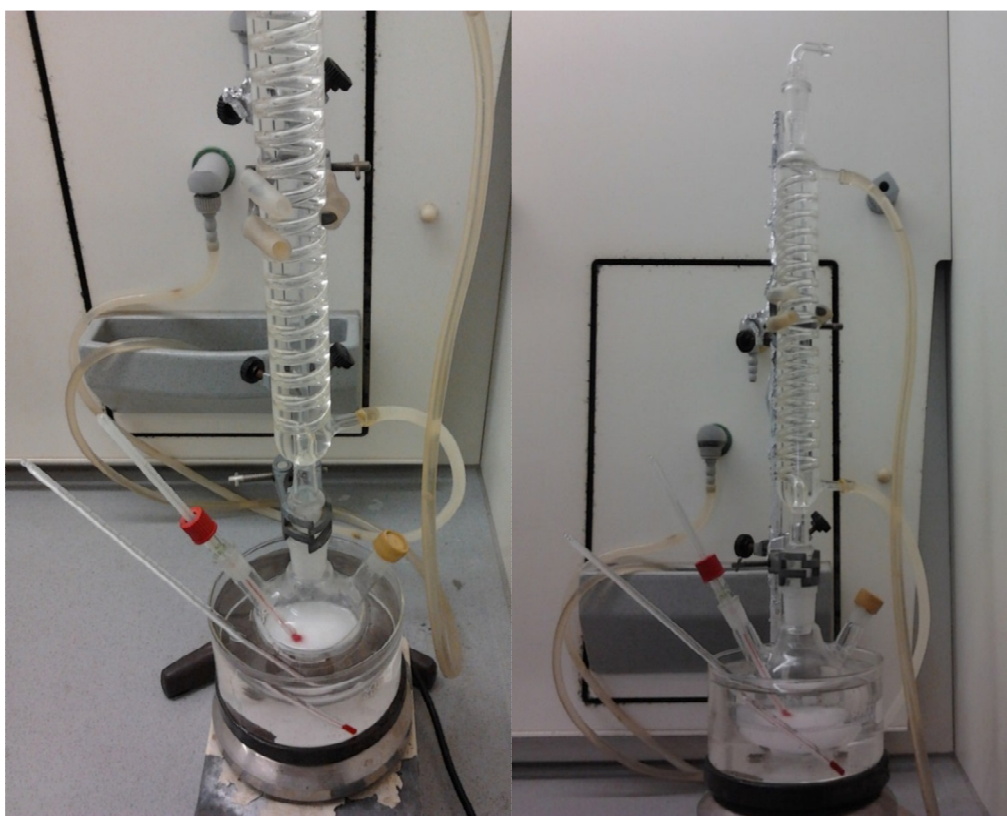


Figura 7 - Ilustração do equipamento utilizado no processo de síntese do MIP.

Após a reação de polimerização o resultante foi sujeito a filtração com ajuda de uma bomba de vácuo. O polímero obtido foi lavado com acetona de forma a remover eventuais vestígios de reagentes que tenham sobrado.

A produção do NIP seguiu a mesma metodologia, tendo em conta que neste caso não foi adicionado *template*.

4.5 Otimização do processo de síntese

Com o objetivo de otimizar a fase de síntese do MIP foi estudada a influência da aplicação de diferentes razões molares das espécies químicas. Desta forma foram preparadas nove formulações diferentes variando entre elas as razões *template*/monómero e *template*/*cross-linker*. As diferentes formulações aplicadas são apresentadas na Tabela 6.

A quantidade de AIBN utilizada em cada formulação corresponde a 1% da soma das massas de monómero funcional e *cross-linker*. Por sua vez a quantidade de ACN (solvente porogénico) utilizada foi cerca de 1,5 vezes a mesma soma. Em todas a formulações foram utilizados 400 mg de PVA e 50 mL de H₂O (Cormack e Elorza, 2004).

Tabela 6 - Razões molares de *template*, monómero e *cross-linker* empregadas na síntese dos polímeros.

Polímero	<i>Template</i> /Monómero	<i>Template</i> /Cross-linker
MIP 1	1/4	1/8
MIP 2		1/12
MIP 3		1/20
MIP 4	1/6	1/12
MIP 5		1/18
MIP 6		1/30
MIP 7	1/8	1/16
MIP 8		1/24
MIP 9		1/40

Para comparar os diferentes polímeros produzidos foi definido o critério de taxa de impressão. De uma forma simplificada este critério permite estimar a quantidade de *template* que ficou impresso no polímero. A metodologia de cálculo envolve a análise da mistura reacional findo a etapa de síntese mas anterior ao processo de filtração e lavagem com acetona. Após a síntese de cada polímero foi retirada uma amostra de 5 mL da fase líquida da mistura reacional. Essa amostra foi filtrada por um filtro PTFE e levada a analisar por HPLC-FL. Este tipo de amostra foi denominado filtrado. Comparando a quantidade de *galaxolide* utilizado na fase de síntese com o restante que sobra na mistura após a etapa de síntese, é possível estimar a quantidade impressa (1), ou seja, que ficou retida nas cavidades do polímero. De notar que foi necessária a uma diluição de 1:100 de forma a poder analisar o filtrado pelo método desenvolvido.

$$\% \text{ Taxa de impressão} = \frac{m_{\text{galaxolide}_{\text{inicial}}} - m_{\text{galaxolide}_{\text{filtrado}}}}{m_{\text{galaxolide}_{\text{inicial}}}} \times 100 \quad (1)$$

Em que $m_{\text{galaxolide}_{\text{inicial}}}$ é a quantidade de *galaxolide* utilizada na polimerização, em mg, e $m_{\text{galaxolide}_{\text{filtrado}}}$ é a quantidade de *galaxolide* restante na mistura reacional, em mg.

4.6 Extração do *template*

Para que o MIP possa ter uma aplicação prática é necessário primeiro remover o *template* retido na matriz do polímero. A qualidade desta extração é de elevada importância na medida em que afeta a disponibilidade das cavidades presentes no MIP capazes de captar o analito. Por outro lado, o grau de extração que seja necessário atingir está dependente da subsequente aplicação que se pretenda dar ao MIP. Uma extração incompleta pode criar problemas no caso de o polímero ter como finalidade aplicações analíticas devido ao referido *bleeding*, que influenciará erroneamente os resultados (Ellwanger *et al.*, 2001).

Este processo pode ser levado a cabo por meio de várias técnicas envolvendo extração por solventes, extrações fisicamente assistidas e extração com solventes em condições sub ou supercríticas (Lorenzo *et al.*, 2011).

Devido ao pouco tempo disponível para realização do projeto não foi possível estudar qual a melhor metodologia a aplicar neste caso concreto. Baseado novamente no projeto anteriormente desenvolvido para o MIP melamina e tendo em conta que as espécies químicas aplicadas são também as mesmas (à exceção do *template*) optou-se pela aplicação do método de extração por *Soxhlet*.

A extração com *Soxhlet* permite na maior parte dos casos obter resultados até 99% de eficiência de extração. Este é dos métodos mais utilizados devido à sua facilidade de aplicação. É aplicável a diferentes matrizes poliméricas e não exige processos de filtração após a sua realização. No entanto vários estudos mostram que uma pequena porção do *template* acaba por ficar retida na matriz polimérica mesmo após vários ciclos de extração. A escolha do solvente a utilizar é muito importante na medida em que este deve ser capaz de interagir com a matriz do MIP, provocando um inchamento na sua estrutura e facilitando assim a remoção das moléculas de *template*. O eluente é muitas vezes combinado com um ácido ou uma base pois estas espécies possuem a capacidade de romper as interações entre o *template* e a matriz do polímero (Ellwanger *et al.*, 2001).

A remoção do *galaxolide* foi então feita via *Soxhlet* utilizando como solvente de extração uma solução de 300 mL de metanol/ácido acético (9/1, v/v). A extração foi efetuada com o solvente quente, favorecendo a solubilização do *template*. O processo foi levado a cabo em três ciclos de 24 horas e no final o polímero foi sujeito a um novo ciclo utilizando apenas metanol, de forma a remover o ácido acético proveniente da fase anterior. O ensaio de extração realizado está ilustrado na Figura 8.



Figura 8 - Ilustração do ensaio de extração por Soxhlet.

O método aplicado na avaliação da eficiência de extração envolve a comparação da quantidade de *galaxolide* que foi lavada pelo solvente (extrato) com a quantidade que tinha sido impressa, como demonstra a equação 2.

$$\% \text{ Eficiência de extração} = \frac{m_{\text{galaxolide}_{\text{extrato}}}}{m_{\text{galaxolide}_{\text{impressa}}}} \times 100 \quad (2)$$

Em que $m_{\text{galaxolide}_{\text{extrato}}}$ é a quantidade de *galaxolide* presente no solvente após a extração, em mg, e $m_{\text{galaxolide}_{\text{impressa}}}$ é a quantidade de *galaxolide* impressa na síntese do polímero, em mg.

Após cada ciclo de extração, o extrato, sujeito às diluições necessárias, foi analisado pelo método desenvolvido em HPLC-FL de forma a quantificar o *galaxolide* presente na amostra.

4.7 Estudo da influência do solvente no processo de adsorção do MIP

Na literatura é descrito que os MIPs maximizam a sua capacidade fixativa quando o analito se encontra dissolvido no mesmo solvente que foi utilizado no processo de síntese (solvente porogénico), uma vez que desta forma são recriadas as mesmas interações que ocorreram durante a polimerização (Hosoya *et al.*, 1998), (Pichon e Chapuis-Hugon, 2008).

Com o objetivo de estudar a influência do solvente na capacidade fixativa do MIP foi realizado um ensaio de adsorção em três solventes diferentes: H₂O, ACN/H₂O (80/20) e o originalmente utilizado na polimerização, ACN. Foram pesados 10 mg de MIP4 para três frascos pequenos e adicionados 5 mL de cada solvente com uma concentração de *galaxolide*

de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Após 24 horas a 25 °C e agitação constante foi retirada uma amostra de cada solvente e analisada por HPLC-FL. Os ensaios foram realizados em duplicado.

Para ser possível analisar estas amostras foi necessário desenvolver duas novas retas de calibração: uma de HHCB em H₂O e outra de HHCB em ACN. Para construção das retas foram preparados padrões com concentrações entre 1 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os padrões foram preparados em balões volumétricos de 10 mL a partir da solução mãe inicial de *galaxolide* em metanol diluída nos dois novos solventes.

4.8 Tratamento/encaminhamento de resíduos

Os resíduos gerados durante o trabalho consistiram essencialmente em soluções orgânicas contendo acetonitrilo, água, *galaxolide* e misturas de MAA, EGDMA, PVA, AIBN provenientes da fase de polimerização. Da fase de extração são também provenientes soluções de metanol e ácido acético juntamente com *galaxolide*. Os resíduos foram armazenados em recipientes devidamente rotulados como *resíduos de compostos orgânicos*. Permaneceram fechados, protegidos da luz e longe de fontes de ignição e posteriormente foram encaminhados para o tratamento de resíduos do EcoFEUP (Sistema de Gestão Ambiental da FEUP).

5 Resultados e Discussão

5.1 Validação do método analítico de *galaxolide* por HPLC-FL

Na Figura 9 é apresentado um cromatograma resultante da injeção de um padrão de *galaxolide* 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$, em ACN/ H_2O (80/20). Para as condições analíticas utilizadas o tempo de retenção médio foi $16,8 \pm 0,03$ minutos.

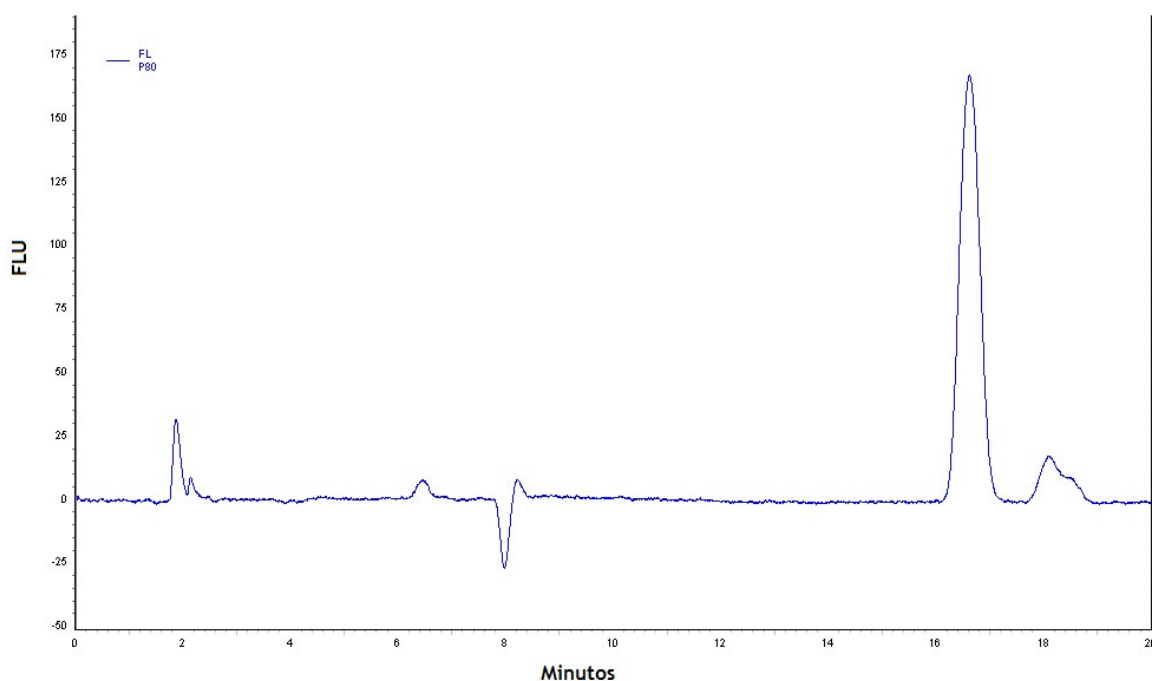


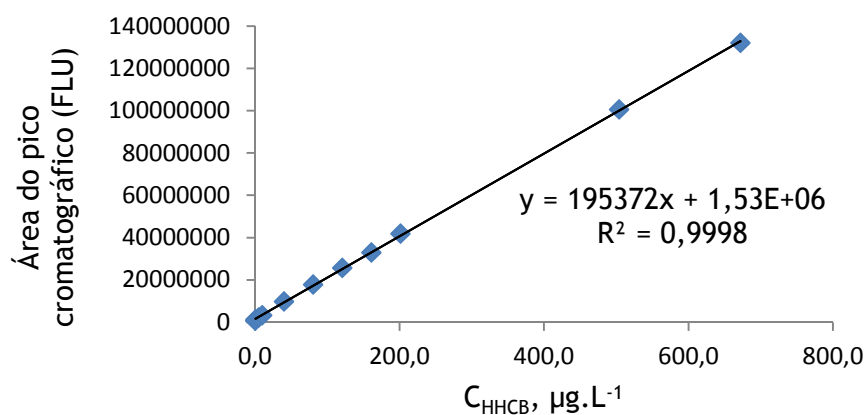
Figura 9 - Cromatograma correspondente ao padrão de HHCB, 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$, em ACN/ H_2O .

Para elaboração da reta de calibração foram injetados 11 padrões em duplicado com concentrações compreendidas entre 0,4 e 700 $\mu\text{g.L}^{-1}$, como apresenta a Tabela 7, correspondendo a $\text{Área}_{\text{média}}$ à média dos dois sinais obtidos.

Tabela 7 - Padrões injetados de HHCB em ACN/H₂O para obtenção da reta de calibração e respectiva resposta.

Padrão	C, µg.L ⁻¹	Área _{média}	Desvio-padrão	%CV
1	0,4	642013	5919,9	0,9
2	1,0	1281310	15147,6	1,2
3	5,0	2143591	12155,2	0,6
4	10,1	3304590,5	27269,6	0,8
5	40,3	9739000	224947,6	2,3
6	80,6	17861998	104378,9	0,6
7	121,0	25708370,5	20520,9	0,1
8	161,3	32890795	137096,7	0,4
9	201,6	41907021	19217,7	0,0
10	504,0	100454564	266536,8	0,3
11	672,0	132032756,5	449109,7	0,3

A reta de calibração obtida está representada na Figura 10 juntamente com a respectiva equação linear e coeficiente de correlação.

Figura 10 - Reta de calibração de HHCB em ACN/H₂O.

Os parâmetros de linearidade associados à reta de calibração como o coeficiente de correlação, o erro relativo do declive e o intervalo da ordenada na origem são apresentados na Tabela 8.

Corretamente o coeficiente de correlação, R^2 , é superior a 0,995, o erro relativo do declive é inferior a 5% (Lindholm, 2004). O intervalo de ordenada na origem devia conter a origem no entanto não foi possível alcançar esse resultado. Mesmo repetindo, por várias vezes, a preparação de padrões e a respetiva reta de calibração, não foi possível atingir os parâmetros pretendidos. No entanto, tendo em conta o fim a que se destina (análise de filtrados, extratos e amostras dos ensaios de adsorção) pode concluir-se que a reta de calibração obtida é adequada para ser utilizada.

Tabela 8 - Parâmetros de linearidade associados à reta de calibração da quantificação do HHCB (sendo A a área do pico cromatográfico e C a concentração de HHCB em $\mu\text{g.L}^{-1}$).

$$A = 195372.C + 1,53 \times 10^6$$

R^2	0,9998
s_a/a	0,5%
$b - s_b$	1279490
$b + s_b$	1778139

A estimativa dos limites de deteção (concentração mínima a partir da qual é possível deduzir a presença do analito) e quantificação (a mais pequena concentração de analito que é possível medir, com o grau de exatidão e precisão definidos pelo método) foi calculada considerando uma razão sinal/ruído (S/N) igual a 3 para o primeiro, e $S/N = 10$, para o segundo (Lindholm, 2004). A Tabela 9 mostra os limites encontrados.

Tabela 9 - Limites de deteção (X_{LD}) e quantificação (X_{LQ}) obtidos para a reta de calibração

$X_{LD}, \mu\text{g.L}^{-1}$	0,09
$X_{LQ}, \mu\text{g.L}^{-1}$	0,30

Conclui-se assim que a concentração mínima a partir da qual é possível detetar o HHCB é $0,09 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a concentração mínima que é possível quantificar é de $0,30 \mu\text{g.L}^{-1}$. Estes limites são considerados satisfatórios tendo em conta as concentrações que se pretendem analisar dos filtrados e extratos resultantes do processo de síntese do MIP.

5.1.1 Avaliação da precisão

A precisão pode ser definida como o grau de proximidade entre resultados referentes à mesma amostra. A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermédia. A repetibilidade é definida como o desvio-padrão relativo de no mínimo seis determinações do mesmo padrão, nas mesmas condições e no intervalo de tempo mais curto possível. A precisão intermédia é expressa através do desvio-padrão relativo de no mínimo seis determinações do mesmo padrão, fazendo variar uma das condições experimentais (Lindholm, 2004).

A avaliação da repetibilidade foi realizada através da injeção de três padrões de concentração 0,4, 200 e 700 $\mu\text{g.L}^{-1}$, no mesmo dia. Foram feitas seis injeções de cada padrão estando os resultados, expressos em termos de coeficiente de variação (%CV), apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores obtidos para cálculo da repetibilidade.

Concentração, $\mu\text{g.L}^{-1}$	Área _{média}	Desvio-padrão	%CV
0,4	852905	45127	5,3
200	44857735	787139	1,8
700	133013063	3556873	2,7

Para avaliar a precisão intermédia os mesmos 3 padrões referidos em cima foram injetados, em duplicado, em seis dias diferentes representando a Tabela 11 os resultados obtidos (%CV).

Tabela 11 - Valores obtidos para cálculo da precisão intermédia.

Concentração, $\mu\text{g.L}^{-1}$	Área _{média}	Desvio-padrão	%CV
0,4	800182	104833	13,1
200	43154734	2428300	5,6
700	132686294	2808454	2,1

Normalmente consideram-se aceitáveis valores até 15%, tendo em conta o método empregue e a gama de concentrações de trabalho (na ordem dos $\mu\text{g.L}^{-1}$). Desta forma é possível concluir que o método é preciso.

5.1.2 Avaliação da exatidão

A exatidão mede o grau de proximidade entre o resultado obtido e o resultado esperado (Lindholm, 2004)

Para avaliação da exatidão foi utilizado o método de adições de padrão. A uma amostra de filtrado e de extrato, foi adicionado um volume de 100 μL de padrão de *galaxolide* em ACN/ H_2O (80/20) de concentração conhecida ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$). Avaliando a resposta do método analítico para as amostras, antes e depois da adição de padrão, é possível comparar a massa de *galaxolide* obtida com a esperada. A recuperação (%R) foi calculada através da razão entre estes dois parâmetros (Tabela 12).

Tabela 12 - Cálculo da percentagem de recuperação.

Amostra	Área _{média}	C, $\mu\text{g.L}^{-1}$	m _{obtida} , μg	m _{esperada} , μg	%R
Extrato 4	14688659	67,4	---	---	116,6
Extrato 4 com adição padrão	19646665	92,7	0,102	0,087	
Filtrado 4	18623270	87,5	---	---	94,1
Filtrado 4 com adição padrão	19507843	92,0	0,101	0,108	

A recuperação obtida é considerada aceitável para este tipo de análise.

5.2 Avaliação da taxa impressão do HHCB no MIP

O método para avaliação da taxa de impressão do *template* no polímero permitiu obter os resultados apresentados na Tabela 13. Como é possível observar, neste caso, as razões *template*/monómero e monómero/*cross-linker* não demonstram influenciar significativamente as taxas de impressão, que se mantêm na casa dos 99% para todas as formulações. Admite-se portanto que o *galaxolide* fica retido quase na sua totalidade no polímero.

Tabela 13 - Taxa de impressão do *galaxolide* para as diferentes formulações.

Polímero	T/M*	M/XL**	% HHCB impressa
MIP 1		1/2	99,6
MIP 2	1/4	1/3	99,9
MIP 3		1/5	99,9
MIP 4		1/2	99,8
MIP 5	1/6	1/3	99,6
MIP 6		1/5	99,9
MIP 7		1/2	98,7
MIP 8	1/8	1/3	99,0
MIP 9		1/5	99,6

*Razão entre *template* e monómero; **Razão entre monómero e *cross-linker*.

5.3 Avaliação da eficiência de extração de HHCB no MIP

O processo de extração do *template* via *Soxhlet* envolve o consumo de elevadas quantidades de solventes pelo que, após se ter verificado que as eficiências de extração não iam além dos 60% (Figura 11) nos primeiros seis polímeros optou-se por não aplicar o processo de extração aos restantes (7,8,9).

As eficiências de extração são bastante reduzidas indicando que, na maioria dos casos cerca de 50% do HHCB ou acaba por ficar retido no MIP ou está a ser arrastado noutra etapa do processo.

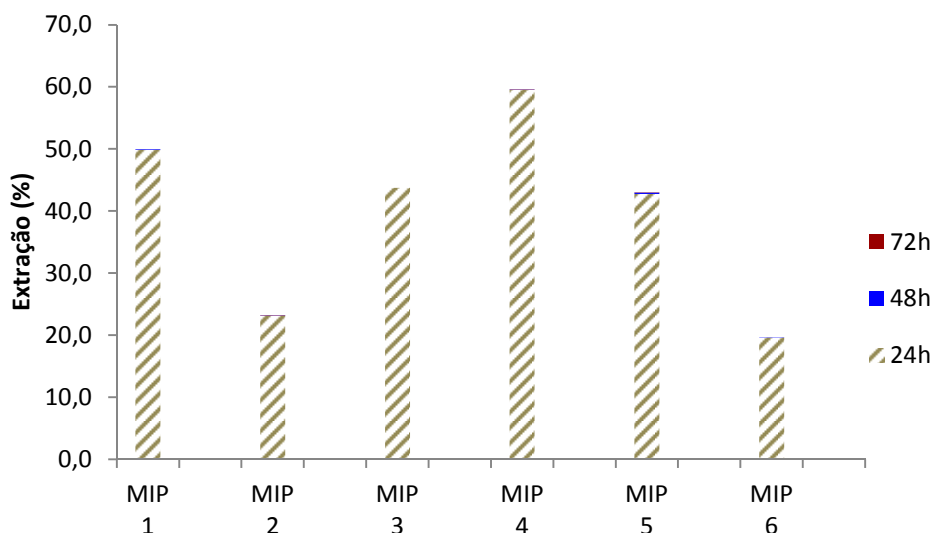


Figura 11 - Eficiência de extração nos primeiros 6 MIPs.

Analizando todas as etapas a que o MIP era sujeito chegou-se à conclusão que a lavagem com acetona poderia estar a arrastar uma parte do HHCB. Por esta razão procedeu-se à síntese de mais dois MIPs de forma avaliar a questão em causa. Foi repetida a formulação do MIP 4 para estes novos polímeros designados de MIP4A e MIP4B.

Em relação à taxa de impressão, estes novos MIPs apresentaram resultados na mesma ordem de grandeza que os MIPs iniciais, como demonstra a Tabela 14.

Tabela 14 - Taxa de impressão do *galaxolide* no MIP4, 4A e 4B.

Polímero	T/M	M/XL	% HHCB impressa
MIP 4			99,8
MIP 4A	1/6	1/2	99,7
MIP 4B			99,8

O 4A foi lavado com um volume definido de 30 mL, diferindo de todas as formulações prévias em que foram utilizados volumes não contabilizados. No 4B optou-se por não efetuar este processo de lavagem. A Figura 12 apresenta as eficiências de extração do MIP4, 4A e 4B. Tendo em conta que a maioria do *galaxolide* se extrai ao fim de 24 horas e que as quantidades extraídas no terceiro ciclo não são significativas, nestes dois novos casos, optou-se por aplicar apenas dois ciclos de 24 horas de forma a minimizar o consumo dos solventes. Como é possível observar, a eficiência de extração do MIP4B é bastante mais elevada em relação ao verificado anteriormente, rondando os 90%. Atendendo à única diferença utilizada no tratamento deste polímero em relação aos restantes é possível concluir

que grande parte do *galaxolide* está logo a ser arrastado por este solvente, anteriormente à etapa de extração por *Sohxlet*. As eficiências de extração verificadas para os primeiros seis MIPs não correspondem portanto ao valor real uma vez que o *template* presente no polímero não corresponde também ao valor esperado.

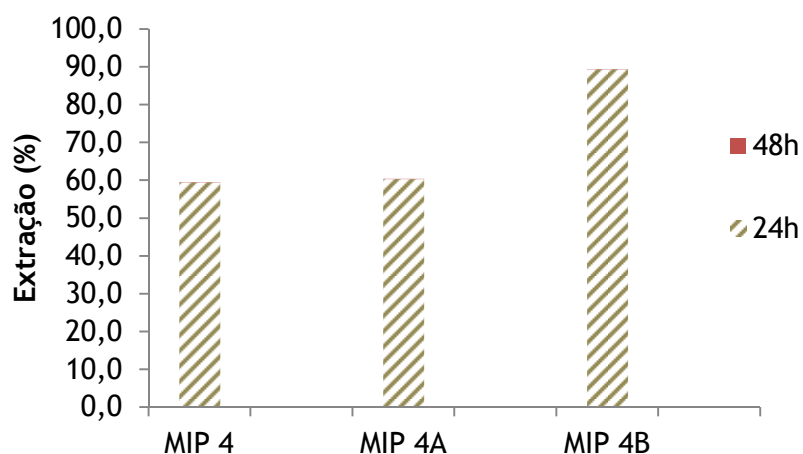


Figura 12 - Eficiências de extração para os MIPs 4, 4A e 4B.

A semelhança verificada entre os MIP 4 e 4A permite concluir que terá sido utilizado um volume próximo de 30 mL para a lavagem do primeiro. O MIP 4B apresenta portanto a eficiência mais elevada uma vez que não foi sujeito à etapa de lavagem, sendo o HHCB apenas removido na etapa de extração.

5.4 Avaliação da influência do solvente no processo de adsorção do MIP

As retas de calibração obtidas para o *galaxolide* em água e em acetonitrilo utilizadas no estudo da influência do solvente estão representadas na Figura 13 juntamente com as respectivas equações lineares e coeficientes de correlação.

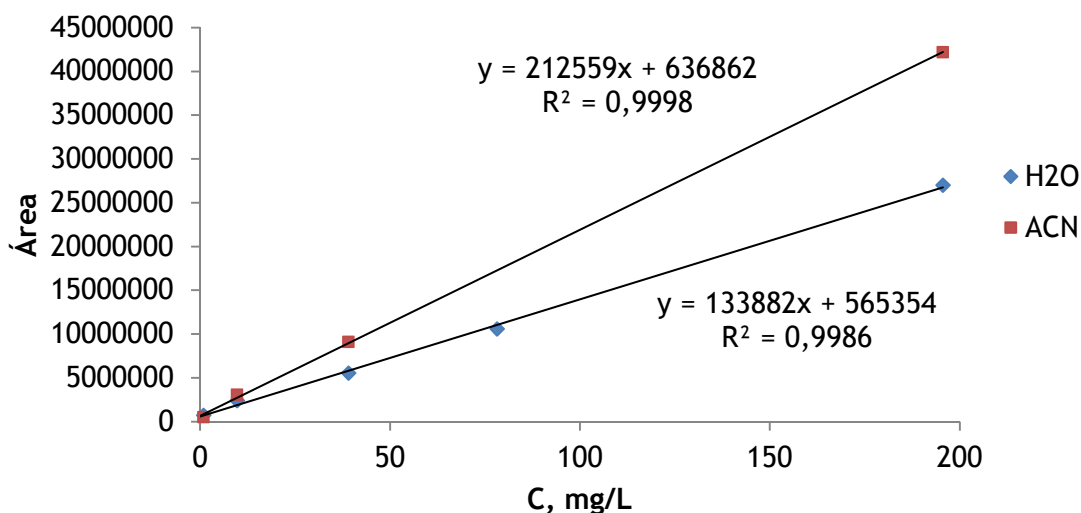


Figura 13 - Retas de calibração para HHCB em H₂O e em ACN.

Em relação ao estudo influência do solvente na capacidade de adsorção do MIP é possível observar, a partir da Figura 14, que as quantidades devolvidas de HHCB tanto em ACN/H₂O como em ACN são inferiores a zero. Isto significa que a quantidade de analito presente nestes dois solventes no final do ensaio é superior à quantidade inicial presente nas soluções preparadas. Daqui se conclui que em vez do analito adsorver ao polímero este fica presente no solvente. Para além disto verifica-se o processo de *bleeding* em que algum do HHCB ainda presente nas cavidades do polímero está a desorver, passando assim para a fase líquida. Para o ensaio em água, as análises devolveram resultados não detetáveis para o método analito desenvolvido pelo que se presume que toda a quantidade de analito presente na solução adsorve às cavidades do polímero. Estes resultados discordam do esperado e presente na literatura segundo a qual o MIP sintetizado terá melhor capacidade de adsorver o analito quando este estiver presente no meio em que o polímero foi sintetizado. Seria então de esperar que o MIP tivesse uma boa capacidade de adsorção do HHCB em ACN. Por outro lado as características hidrofóbicas do composto em estudo poderão ajudar a entender o sucedido.

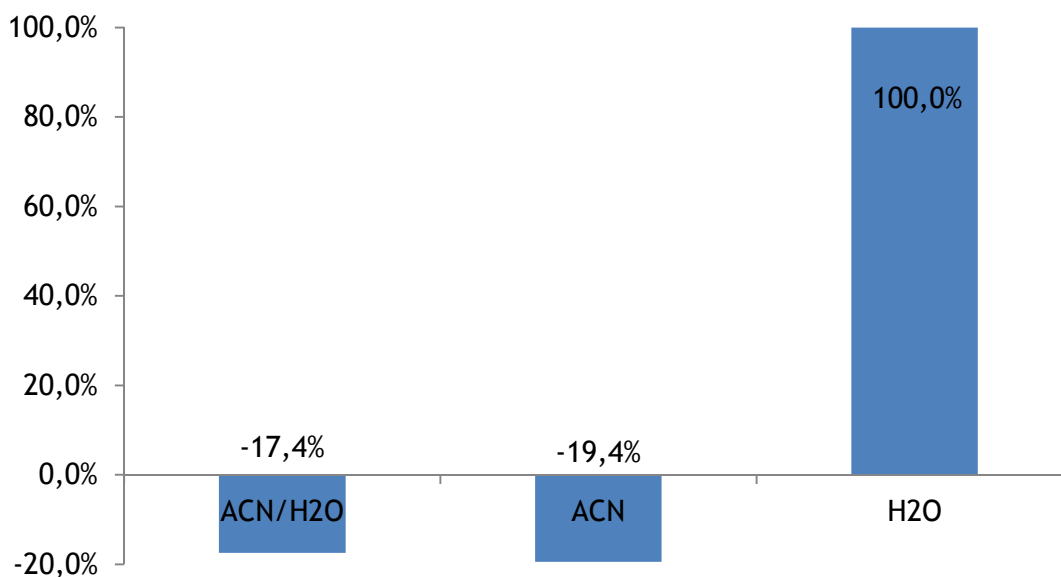


Figura 14 - Estudo de adsorção em ACN/H₂O, ACN e H₂O.

Com o objetivo de confirmar o efeito de *bleeding* referido foi realizado um novo ensaio de adsorção, desta vez com brancos, ou seja, sem adição de *galaxolide*. Aproximadamente 10 mg de MIP4 foram colocados em 3 frascos, cada um com o respectivo solvente a analisar: ACN/H₂O, ACN e H₂O. Após 24 horas a 25 °C e agitação constante foi retirada uma amostra de cada solvente e analisada por HPLC-FL.

Os resultados mostram que 0,25 µg de HHCB desorveram do polímero e passaram para o solvente ACN/H₂O. Por sua vez, para o ACN passaram 0,11 µg. No caso do H₂O não foi possível detectar HHCB na amostra. Desta forma é possível confirmar o efeito de *bleeding* para os solventes ACN/H₂O e ACN.

Por questões de tempo não foi possível avaliar a capacidade adsortiva do polímero de referência (NIP).

6 Conclusões

Este trabalho incidiu sobre o desenvolvimento de um polímero impresso molecularmente seletivo para o *galaxolide*.

O estudo de otimização do processo de síntese permitiu concluir que a variação das razões molares de *template*/monómero funcional e *template*/cross-linker não influenciam de forma significativa as taxas de impressão do *template* no MIP.

O método selecionado para a extração de *galaxolide* não permitiu obter extrações superiores a 90% o que fica um pouco aquém dos 99% referidos na literatura. A extração do *template* é um passo deveras importante na produção de um MIP pelo que quanto mais *template* for possível remover das cavidades do polímero mais cavidades estarão disponíveis para a adsorção do analito, maximizando assim a sua aplicabilidade. Por outro lado a remoção incompleta do *template* poderá dar origem ao processo de *bleeding* influenciando negativamente os resultados obtidos no caso de análises do composto em concentrações vestigiais.

O estudo da influência do solvente em que o analito esteja presente mostrou que o MIP desenvolvido favorece a água. Este resultado diverge do referido na literatura, em que o MIP terá melhor aplicabilidade no solvente que foi utilizado no processo de polimerização. No entanto, tendo em conta o objetivo futuro de análise de matrizes ambientais, este resultado pode ser interessante aquando da análise de águas superficiais ou residuais.

O método analítico desenvolvido para quantificação de *galaxolide* por HPLC-FL mostrou ser satisfatório, com um limite de deteção de 0,09 µg.L⁻¹ e recuperações a variar entre 94 e 117%.

Embora a tecnologia de polímeros impressos molecularmente seja um método promissor para aplicação em análises químicas este projeto representa apenas os primeiros passos no estudo desta tecnologia aplicada ao *galaxolide* pelo há ainda um longo caminho a percorrer com o objetivo de poder aplicar o MIP desenvolvido como sorbente de extração para análise *galaxolide* em matrizes ambientais.

7 Limitações e Trabalho Futuro

Durante a realização deste trabalho foram verificadas algumas limitações associadas aos longos períodos necessários para a síntese e extração do MIP/NIP o que inviabilizou uma caracterização mais completa dos mesmos.

Apesar de todo o trabalho desenvolvido e dos resultados obtidos, será importante, como trabalho futuro a realização de algumas tarefas entre elas:

Estudo de processos alternativos de extração do *template*. Atendendo ao facto de a extração por *Soxhlet* não permitir uma remoção completa do *template* e apresentar como principal desvantagem o elevado consumo de solventes. Será importante testar diferentes métodos, como por exemplo o ultrassons e determinar as respetivas eficiências de extração.

Propõe-se também, avaliar a cinética de adsorção de *galaxolide* em água, pelo MIP e NIP, bem como a determinação das respetivas isotérmicas de adsorção o que permitirá caracterizar as cavidades produzidas no MIP.

Como alternativa ao MIP produzido, sugere-se a síntese de diferentes polímeros com a inclusão de diferentes monómeros e *cross-linkers* de forma a poder aumentar a seletividade do polímero face ao analito em estudo (*galaxolide*).

Tanto quanto é do conhecimento do nosso grupo de investigação, o trabalho realizado define-se como o primeiro passo para a produção de polímeros impressos molecularmente seletivos ao *galaxolide*, contribuindo com o desenvolvimento de metodologias alternativas para análise de poluentes emergentes.

8 Referências Bibliográficas

- Abramsson-Zetterberg, L. and P. Slanina (2002). "Macrocyclic musk compounds—an absence of genotoxicity in the Ames test and the in vivo Micronucleus assay." Toxicology Letters 135(1-2): 155-163.
- Alves, Arminda (2001). "Emerging pollutants: Industrial, personal care and pharmaceutical products". DemSSO, LEPABE, FEUP.
- Aschmann, S. M., J. Arey, R. Atkinson and S. L. Simonich (2001). "Atmospheric Lifetimes and Fates of Selected Fragrance Materials and Volatile Model Compounds." Environmental Science & Technology 35(18): 3595-3600.
- Balk, F. and R. A. Ford (1999). "Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCB in the EU: I. Fate and exposure assessment." Toxicology Letters 111(1-2): 57-79.
- Bester, K. (2009). "Analysis of musk fragrances in environmental samples." Journal of Chromatography A 1216(3): 470-480.
- Breitholtz, M., L. Wollenberger and L. Dinan (2003). "Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*." Aquat Toxicol 63(2): 103-118.
- Chen, L., S. Xu and J. Li (2011). "Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications." Chemical Society Reviews 40(5): 2922-2942.
- Cormack, P. A. G. and A. Z. Elorza (2004). "Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation." Journal of Chromatography B 804(1): 173-182.
- Correia, P., A. Cruz, L. Santos and A. Alves (2013). "Human dermal exposure to galaxolide from personal care products." International Journal of Cosmetic Science 35(3): 299-309.
- Daughton, C. G. and T. A. Ternes (1999). "Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?" Environ Health Perspect 107 Suppl 6: 907-938.
- Deblonde, T., C. Cossu-Leguille and P. Hartemann (2011). "Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature." International Journal of Hygiene and Environmental Health 214(6): 442-448.
- Eh, M. (2004). "New Alicyclic Musks: The Fourth Generation of Musk Odorants." Chemistry & Biodiversity 1(12): 1975-1984.
- Ellwanger, A., C. Berggren, S. Bayoudh, C. Crecenzi, L. Karlsson, P. K. Owens, K. Ensing, P. Cormack, D. Sherrington and B. Sellergren (2001). "Evaluation of methods aimed at complete removal of template from molecularly imprinted polymers." Analyst 126(6): 784-792.

EU-RAR, 2008. (1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylin-deno[5,6-C]pyran HHCB), CAS No: 1222-05-5, EINECS No: 214-946-9. European Union Risk Assessment Report.

Figueiredo, E. C., A. C. B. Dias and M. A. Z. Arruda (2008). "Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos." Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **44**: 361-375.

Fromme, H., T. Otto and K. Pilz (2001). "Polycyclic musk fragrances in different environmental compartments in Berlin (Germany)." Water Research **35**(1): 121-128.

Gomez, E., A. Pillon, H. Fenet, D. Rosain, M. J. Duchesne, J. C. Nicolas, P. Balaguer and C. Casellas (2005). "Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks." J Toxicol Environ Health A **68**(4): 239-251.

Gore, M. A., R. N. Karmalkar and M. G. Kulkarni (2004). "Enhanced capacities and selectivities for cholesterol in aqueous media by molecular imprinting: role of novel cross-linkers." Journal of Chromatography B **804**(1): 211-221.

Haupt, K. (2003). "Peer Reviewed: Molecularly Imprinted Polymers: The Next Generation." Analytical Chemistry **75**(17): 376 A-383 A.

Heberer, T. (2002). "Occurrence, Fate, and Assessment of Polycyclic Musk Residues in the Aquatic Environment of Urban Areas – A Review." Acta hydrochimica et hydrobiologica **30**(5-6): 227-243.

HERA (2004). "Human and Environmental Risk Assessment on Ingredients of Household Products: Polycyclic musks AHTN and HHCB".

Herren, D. and J. D. Berset (2000). "Nitro musks, nitro musk amino metabolites and polycyclic musks in sewage sludges: Quantitative determination by HRGC-ion-trap-MS/MS and mass spectral characterization of the amino metabolites." Chemosphere **40**(5): 565-574.

Hosoya, K., K. Yoshizako, H. Sasaki, K. Kimata and N. Tanaka (1998). "Molecular recognition towards coplanar polychlorinated biphenyls based on the porogen imprinting effects of xylenes." Journal of Chromatography A **828**(1-2): 91-94.

Kim, H. (2004). New Insights Into the Binding Site Formation and the Performance of Molecularly Imprinted Polymers, University of Akron.

Kraft, P. (2004). "'Brain Aided' Musk Design." Chemistry & Biodiversity **1**(12): 1957-1974.

Lindholm, J. (2004). Development and Validation of HPLC Methods for Analytical and Preparative Purposes, Acta Universitatis Upsaliensis.

- Lopez-Nogueroles, M., S. Lordel-Madeleine, A. Chisvert, A. Salvador and V. Pichon (2013). "Development of a selective solid phase extraction method for nitro musk compounds in environmental waters using a molecularly imprinted sorbent." Talanta **110**(0): 128-134.
- Lordel, S., F. Chapuis-Hugon, V. Eudes and V. Pichon (2011). "Selective extraction of nitroaromatic explosives by using molecularly imprinted silica sorbents." Analytical and Bioanalytical Chemistry **399**(1): 449-458.
- Lorenzo, R., A. Carro, C. Alvarez-Lorenzo and A. Concheiro (2011). "To Remove or Not to Remove? The Challenge of Extracting the Template to Make the Cavities Available in Molecularly Imprinted Polymers (MIPs)." International Journal of Molecular Sciences **12**(7): 4327-4347.
- Lu, Y., T. Yuan, W. Wang and K. Kannan (2011). "Concentrations and assessment of exposure to siloxanes and synthetic musks in personal care products from China." Environmental Pollution **159**(12): 3522-3528.
- Luckenbach, T. and D. Epel (2005). "Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters." Environ Health Perspect **113**(1): 17-24.
- Pérez-Moral, N. and A. G. Mayes (2004). "Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods." Analytica Chimica Acta **504**(1): 15-21.
- Pichon, V. and F. Chapuis-Hugon (2008). "Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants—A review." Analytica Chimica Acta **622**(1-2): 48-61.
- Pickthall, J. (1960). "The Musk Odour." Journal of the Society of Cosmetic Chemist: 423-436.
- Prieto, A., S. Schrader, C. Bauer and M. Möder (2011). "Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the determination of fluoroquinolone related compounds in water." Analytica Chimica Acta **685**(2): 146-152.
- Roosens, L., A. Covaci and H. Neels (2007). "Concentrations of synthetic musk compounds in personal care and sanitation products and human exposure profiles through dermal application." Chemosphere **69**(10): 1540-1547.
- Schreurs, R. H., J. Legler, E. Artola-Garicano, T. L. Sinnige, P. H. Lanser, W. Seinen and B. Van der Burg (2004). "In vitro and in vivo antiestrogenic effects of polycyclic musks in zebrafish." Environ Sci Technol **38**(4): 997-1002.
- Schreurs, R. H., E. Sonneveld, J. H. Jansen, W. Seinen and B. van der Burg (2005). "Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen

receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays." Toxicol Sci **83**(2): 264-272.

Schreurs, R. H., E. Sonneveld, P. T. van der Saag, B. van der Burg and W. Seinen (2005). "Examination of the in vitro (anti)estrogenic, (anti)androgenic and (anti)dioxin-like activities of tetralin, indane and isochroman derivatives using receptor-specific bioassays." Toxicol Lett **156**(2): 261-275.

Scott, R. P. W. (1986). Liquid Chromatography Detectors, Elsevier Science.

Simonich, S. L., W. M. Begley, G. Debaere and W. S. Eckhoff (2000). "Trace Analysis of Fragrance Materials in Wastewater and Treated Wastewater." Environmental Science & Technology **34**(6): 959-965.

Sommer, C. (2004). The Role of Musk and Musk Compounds in the Fragrance Industry. Series Anthropogenic Compounds. G. Rimkus, Springer Berlin Heidelberg. **3X**: 1-16.

Stevens, J. L., G. L. Northcott, G. A. Stern, G. T. Tomy and K. C. Jones (2002). "PAHs, PCBs, PCNs, Organochlorine Pesticides, Synthetic Musks, and Polychlorinated n-Alkanes in U.K. Sewage Sludge: Survey Results and Implications." Environmental Science & Technology **37**(3): 462-467.

Tarley, C. R. T., M. D. P. T. Sotomayor and L. T. Kubota (2005). "Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação." Química Nova **28**: 1076-1086.

Umpleby li, R. J., S. C. Baxter, A. M. Rampey, G. T. Rushton, Y. Chen and K. D. Shimizu (2004). "Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers." Journal of Chromatography B **804**(1): 141-149.

Vasapollo, G., R. D. Sole, L. Mergola, M. R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano and G. Mele (2011). "Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective." International Journal of Molecular Sciences **12**(9): 5908-5945.

Vickrey, T. M. (1983). Liquid Chromatography Detectors, Taylor & Francis.

Wollenberger, L., M. Breitholtz, K. Ole Kusk and B. E. Bengtsson (2003). "Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances." Sci Total Environ **305**(1-3): 53-64.

Ye, L., R. Weiss and K. Mosbach (2000). "Synthesis and Characterization of Molecularly Imprinted Microspheres." Macromolecules **33**(22): 8239-8245.

Zhang, X., Y. Yao, X. Zeng, G. Qian, Y. Guo, M. Wu, G. Sheng and J. Fu (2008). "Synthetic musks in the aquatic environment and personal care products in Shanghai, China." Chemosphere **72**(10): 1553-1558.

Anexo 1 Parâmetros da reta de calibração

Neste anexo são apresentadas as fórmulas que serviram de base ao cálculo dos parâmetros da reta de calibração.

Tabela A 1 - Fórmulas de cálculo dos parâmetros da reta de calibração.

Cálculo do declive	$a = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$
Cálculo da ordenada na origem	$b = \frac{\sum_i (y_i)}{n} - a \frac{\sum_i (x_i)}{n}$
Desvio-padrão dos resíduos de linearização de y sobre x	$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n - 2}}$
Variância de a	$s_a^2 = \frac{n s_{y/x}^2}{n \sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2}$
Variância de b	$s_b^2 = \frac{s_{y/x}^2 \sum_i x_i^2}{n \sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2}$
Coeficiente de variação	$R^2 = \left(\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum_i (x_i - \bar{x})^2)(\sum_i (y_i - \bar{y})^2)}} \right)^2$